



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

DANIEL DE CASTRO ASSUMPÇÃO

FLEXIBILIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DE FERMENTAÇÃO
À VÁCUO: PRODUÇÃO DE N-BUTANOL E ETANOL
A PARTIR DE EUCALIPTO

VACCUM FERMENTATION TECHNOLOGY FLEXIBILIZATION:
N-BUTANOL AND ETHANOL PRODUCTION FROM EUCALYPTUS

CAMPINAS
2017

DANIEL DE CASTRO ASSUMPÇÃO

FLEXIBILIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DE FERMENTAÇÃO À VÁCUO:
PRODUÇÃO DE N-BUTANOL E ETANOL A PARTIR DE EUCALIPTO

VACCUM FERMENTATION TECHNOLOGY FLEXIBILIZATION:
N-BUTANOL AND ETHANOL PRODUCTION FROM EUCALYPTUS

*Dissertação apresentada à Faculdade de
engenharia Química da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título
de Mestre em Engenharia Química.*

Orientador: Prof. Dr. Adriano Pinto Mariano

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO ALUNO DANIEL
DE CASTRO ASSUMPÇÃO, E ORIENTADA PELO PROF.
DR. ADRIANO PINTO MARIANO

CAMPINAS
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FUNCAMP, 38615

ORCID: <http://orcid.org/http://orcid.org/00>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

As79f Assumpção, Daniel de Castro, 1989-
Flexibilização da tecnologia de fermentação à vácuo : produção de n-butanol e etanol a partir de eucalipto / Daniel de Castro Assumpção. –
Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Adriano Pinto Mariano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação sob vácuo. 2. Etanol. 3. Butanol. 4. Eucalipto. I. Mariano, Adriano Pinto, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Vacuum fermentation technology flexibilization : n-butanol and ethanol production from eucalyptus

Palavras-chave em inglês:

Vacuum fermentation

Ethanol

Butanol

Eucalyptus

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Adriano Pinto Mariano [Orientador]

Rubens Maciel Filho

Samantha Christine Santos

Data de defesa: 12-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Folha de aprovação

Dissertação de Mestrado defendida por Daniel de Castro Assumpção e aprovada em 12 de julho de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores*:

Prof. Dr. Adriano Pinto Mariano

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

Dra. Samantha Christine Santos

*Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Agradecimentos

Este trabalho definitivamente é obra de um coletivo e tentarei agradecer a todos que contribuíram, mesmo sabendo que estas poucas palavras não exprimem minha real gratidão.

Por ordem cronológica, agradeço aos meus pais, Nelson e Fátima Assumpção que, apesar de terem hesitado em um primeiro momento, jamais me negaram esforços e ajuda durante estes dois anos e todos os outros de minha existência. Espero retribuir à sociedade a formação que vocês me deram.

Agradeço aos meus amigos Rafael Marques e Caio Carvalho por me fazerem perceber que eu deveria migrar do setor empresarial e direcionar minha carreira para me tornar professor. À Prof^{fa}. Dr^a. Ângela Maria Moraes e Prof^{fa}. Dr^a. Lucimara de la Torre, por serem minhas mentoras no processo de transição para o mestrado.

Agradeço ao Prof. Dr. Adriano Mariano pela orientação e companheirismo ao longo destes dois anos. Obrigado por claramente depositar muita confiança em meu trabalho, me dando liberdade de agir e pelas excelentes oportunidades profissionais. Espero que os resultados tenham atendido as expectativas.

Agradeço a Unicamp/FAEPEX, não apenas pelo financiamento do projeto, mas pelo ambiente plural dentro do campus. Respirar um ambiente repleto de diversidade de pessoas e pensares apenas enriquece a formação como profissional.

Agradeço à Fibria Celulose S/A pela doação de lotes de cavacos de eucalipto, à Novozymes pela doação de amostras de coquetel enzimático e à Usina Santa Adélia e Prof. Francisco Maugeri Filho pela doação da cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Agradeço aos meus amigos de mestrado: Daniele Cunha, Bárbara Ciocca, Thayanra Coradini e Nahieh Miranda, pela convivência e apoio técnico e emocional ao longo do projeto. Agradeço a Jean Felipe Leal Silva, não apenas pela amizade, mas por me ajudar a raciocinar em momentos de pressão em que agilidade se fez

necessário; apesar do nosso modo distinto de encarar a vida, saiba que você tem meu respeito e admiração profissional. A Henrique Brasil, por ter sido meu suporte emocional ao longo destes dois anos e me lembrar da importância do lazer. A minha grande amiga Bruna Vêras, por me trazer de volta à Maceió, que tanto amo, sem entrar em um avião. Vocês deram alma a esta dissertação.

No suporte técnico, agradeço a Alessia Ficalbi, Chiara Prefumo, Fernando Sampaio e Katia Viscardi, que me forneceram a base do conhecimento técnico necessária para eu desenvolver minhas atividades em sua plenitude. A Emília Lopes, John Hervin, Daniele Machado e Prof^a. Dr^a. Laura Plazas por me ensinarem as técnicas de laboratório necessárias para que eu conduzisse os experimentos e, acima de tudo, compreendesse o objeto de estudo.

Aos professores Dr^a. Aline da Costa, Dr^a. Marisa Beppu, Dr. José Vicente D'Ângelo, Dr^a. Ana Maria Frattini e Dr^a. Maria Alvina Krahenbühl por contribuírem na minha formação como mestre. Aos professores Dr. Rubens Maciel Filho, Dr^a. Maria Regina Wolf Maciel, Dr^a. Aline da Costa, Dr^a. Telma Franco, Dr. Antônio Carlos Lisbôa e Dr. Osvaldir Taranto, pelos laboratórios para o desenvolvimento das atividades.

Agradeço à Dr^a. Ingrid Rocha, Maria Luisa Krahenbühl, Silvana Neves, Evandro Miranda e Sandra Pires por terem sido grandes facilitadores das atividades desenvolvidas nestes anos. Agradeço em especial a D. Carmen e Sr. Laerte por sempre manterem nossos laboratórios tão limpos e prontos para o uso.

Agradeço a Daniel Fernandes, Carla Vieira e Willian Nunes por aparecerem ao final do projeto e me darem o suporte necessário para que a pesquisa fosse finalizada. Sem a ajuda de vocês eu não teria concluído meus experimentos.

Agradeço a FAPESP e pela Ohio State University pela concessão da Mobility Grant Proposal no 15/50243-2, que permitiu que parte dos experimentos fosse conduzida com Prof. Dr. Thaddeus Ezeji, especialista na área de fermentação. Por fim, agradeço ao Dr. Elmer Ccopa pela hospitalidade.

RESUMO

O setor de papel e celulose tem dado claros indícios de mudança em sua estratégia industrial e comercial. O anseio pela produção de novos produtos a partir de fonte renovável (como por exemplo, cavacos de eucalipto) tem sido uma das principais forças que estão levando o setor buscar por outras tecnologias. Dentre estes produtos, destacam-se os combustíveis como etanol e butanol, que podem ser produzidos pela fermentação dos açúcares celulósicos presentes no eucalipto. Devido à toxicidade dos próprios produtos, as fermentações tendem a ocorrer em meios reacionais diluídos, que implicam em elevados dispêndios energéticos e produção de vinhaça elevada, que podem reduzir a atratividade econômica de projetos. Aliada a motivação de se criar uma tecnologia que supere a problemática da inibição, está o interesse econômico em processos flexíveis, que permitem a criação de um negócio robusto frente a oscilações do mercado. Sendo assim, este projeto de caráter exploratório busca obter os principais rendimentos de um processo de fermentação flexível e intensivo.

Em um primeiro momento, avaliou-se a produção de meio de cultivo de microrganismos a partir de eucalipto. Para tanto, pré-tratou-se eucalipto com ácido sulfúrico diluído a diversas condições, seguido de uma hidrólise enzimática. Para uma hidrólise enzimática com 10% de teor de sólidos, foram alcançados concentrações baixas de glicose – na faixa de 5 g/L – e rendimentos globais de processo em glicose (pré-tratamento e hidrólise enzimática) na faixa dos 6%.

Suplementou-se o caldo com glicose sintética para a realização dos ensaios de fermentação alcoólica para a produção de acetona, n-butanol e etanol (ABE). Avaliou-se fermentação batelada, fermentação batelada com aplicação de vácuo intermitente e fermentação semi-batelada com aplicação de vácuo intermitente (apenas na fermentação etanólica).

Para a fermentação etanólica, observou-se que o tempo de reação diminuiu em 3h comparando batelada com batelada mais vácuo intermitente, aumentando a

produtividade de 2,66 g/Lh para 3,20 g/L.h. Para os ensaios semi-batelada com vácuo intermitente, a produtividade foi inferior (1,74 g/Lh) pois o fornecimento de substrato era inferior a taxa de metabolização, levando a períodos de inatividade do microrganismos.

Com relação à fermentação ABE, verificou-se que a metabolização de substrato rico em pentoses ocorre muito lentamente (cerca de 84h totais) com baixas conversões do substrato (cerca de 40%), não justificando uma operação com vácuo. Já a fermentação de substrato com hexoses e pentoses é concluída após 72h de operação em batelada, com produtividade de 0,178 g/Lh de ABE. A aplicação de vácuo no mesmo ensaio aumentou a produtividade do processo para 0,293 g/Lh.

Com este trabalho, observou-se que a utilização da tecnologia a vácuo leva ao aumento de produtividade em ambos os processos fermentativos, o que resulta em um menor número de reatores quando comparando batelada com batelada mais vácuo intermitente. Além disso, o estudo de flexibilização mostrou que a produção integrada de ABE e etanol utilizando a tecnologia a vácuo também reduz o número de equipamentos, diminuindo o custo de capital da biorrefinaria.

ABSTRACT

The pulp and paper industry has been giving clear signs that its commercial and industrial strategy will change soon. The will to produce new products from renewable sources (such as eucalyptus wood chips) is one of the main driving forces pushing this sector to seek for different technologies. Among these products, we highlight fuels such as n-butanol and ethanol, which can be produced by the fermentation of lignocellulosic sugars, present in the eucalyptus structure. Due to the products toxicity for the microorganisms, fermentations tends to occur in diluted media, which implies in higher energy demand and industrial waste – factors that usually reduces industrial projects economic attractiveness. Allied to the motivation to create a technology that overcomes the product inhibition issue, there is the economic interest in flexible processes, which allows the creation of a business model robust to market oscillations. Therefore, this exploratory research Project aims to obtain the main industrial yields of an intensive and flexible fermentative process.

In a first moment, fermentation broth production from eucalyptus was assessed. Eucalyptus wood chips were treated with sulfuric acid at different conditions, followed by an enzymatic hydrolysis with dry matter content of 10%. Low glucose concentrations were obtained – about 5 g/L –and global process (pre treatment and hydrolysis) yields of 6%.

The fermentation broth was the supplied with synthetic sugars to carry out the ethanolic and ABE (acetone, n-butanol and ethanol) fermentations essays. Three operational fermentation modes were evaluated: batch, batch with intermittent vacuum and semi-batch with intermittent vacuum (the last one only for ethanol production),

For the ethanol production, it was observed that the batch with intermittent vacuum reaction is 3h shorter and has an average productivity of 3,20 g/L.h, whereas the batch fermentation has 2,66 g/L.h. Semi-batch with intermittent vacuum

presented a lower productivity (1,74 g/L.h) because the substrate supply was not as high as the metabolization rate, leading to idle periods for the microorganism.

Regarding the ABE fermentation, it was observed that the metabolizations of substrates rich in pentose occurred at low rates with low substrate conversion (approximately 40%), not justifying the intermittent vacuum operation. On the other hand, the substrate composed by both hexoses and pentoses is concluded after 72 h in batch operation, with 0,178 g/L.h of ABE. The use of intermittent vacuum for this fermentation increased the process productivity to an average value of 0,293 g/L.h.

In this study, we observed that the use of combined fermentation and vacuum extraction operations leads to a productivity increase in both ethanol and ABE fermentation, requiring less fermenters in industrial scale when comparing batch fermentation and batch fermentation with intermittent vacuum. Besides that, the flexibilization study showed that integrated ABE end ethanol fermentation using vacuum technology also implies in less fermenters required.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: representação da estrutura vegetal da parede celular secundária de uma biomassa lignocelulósica típica. Adaptado - (Rubin 2008)	27
Figura 2: Estrutura química da celulose e ilustração das ligações de hidrogênio presentes na molécula (Nelson & Cox 2011).	28
Figura 3: Composição química do cavaco de eucalipto, bagaço de cana-de-açúcar e palha de cana-de-açúcar (Carvalho et al. 2015).....	29
Figura 4: Possíveis produtos de uma biorrefinaria lignocelulósica. Adaptado de (Kaam & Gruber 2006).....	31
Figura 5: Diagrama mostrando alguns produtos e potenciais produtos de degradação formados a partir das frações de celulose, hemicelulose e lignina durante pré-tratamento. Em vermelho são indicados os principais inibidores de atividades microbianas. Adaptado (Modenbach & Nokes 2012).....	34
Figura 6: Diagrama de blocos do processo estudado neste trabalho	42
Figura 7: Moinho de martelos e motor de indução de 3800 rpm utilizado para processar o eucalipto.....	51
Figura 8: Eucalipto em cavacos e eucalipto moído pelo moinho.....	52
Figura 9: Fluxograma com todas as etapas utilizadas para determinar a composição química do eucalipto.	53
Figura 10: Distribuição granulométrica do eucalipto moído	54
Figura 11: Composição química em base seca do eucalipto utilizado como matéria-prima.....	55
Figura 12: Difratoograma da análise de eucalipto in natura.	56
Figura 13: Dados experimentais obtidos na determinação da atividade enzimática da celulase	60
Figura 14: Dados experimentais obtidos na determinação da atividade enzimática da β -glicosidase.	61
Figura 15: Reator em aço inox e banho termostático utilizados para reações a temperaturas superiores a 121°C (Agradecimento a LEPFE).....	68
Figura 16: Fluxograma com todas as etapas utilizadas para determinar a composição química de polpas obtidas ao longo do processo.	71
Figura 17: Gráfico dos valores normais esperado em variável codificada	73
Figura 18: Superfície de resposta que mostra a variação da concentração de glicose em função do teor de sólidos e de ácido sulfúrico	74
Figura 19: Difratoograma de raios-x para as biomassa in natura e após diversos pré-tratamentos.....	83
Figura 20: Reator utilizado para a reação de hidrólise enzimática.....	85
Figura 21: Crescimento celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio sintético.	91
Figura 22: comparação entre consumo de glicose de produção de etanol em hidrolisado de eucalipto com diferentes suplementações.....	91
Figura 23: Ensaio de crescimento em meio definido para inóculo.	92
Figura 24: Ensaio de crescimento em meio definido para fermentação.	92

Figura 25: Aparato experimental utilizado nos ensaio de extração e fermentação com aplicação de vácuo - 1. Conjunto do biorreator; 1a. Biorreator; 1b. Agitador; 1c. Condensador, duto de alívio de pressão e alimentação de gás nitrogênio; 1d. Entrada de água de aquecimento/resfriamento; 1e. Sistema de amostragem; 1f. Válvula de alimentação de gás nitrogênio; 1g. Sistema supervisorio e suporte de bombas peristálticas de alimentação. – 2. Meio para operação semi-batelada – 3. Vacuômetro – 4. Balão de coleta de etanol extraído – 5. Sistema de condensação; 5a. Condensador espiral; 5b. Banho termostático com etileno glicol – 6. Válvula agulha – 7. Bomba a vácuo – 8. Armadilha de água para absorver o etanol não condensado.....	96
Figura 26: Resultados do ensaio de extração de etanol do reator.....	97
Figura 27: Aparato experimental utilizado nos ensaio de extração e fermentação com aplicação de vácuo, composto por biorreator e sistema supervisorio e suporte de bombas peristálticas de alimentação; balão de coleta de etanol extraído; sistema de condensação (condensador espiral e banho termostático com etileno glicol); Bomba a vácuo; armadilha de água para absorver o etanol não condensado e cilindro de gás nitrogênio.....	98
Figura 28: Crescimento celular médio dos ensaios de fermentação em batelada. Em evidência, as fases de crescimento celular (A = fase de latência; B = crescimento exponencial; C = crescimento retardado e; D = fase estacionária).....	99
Figura 29: Ajuste do modelo logístico aos dados experimentais de crescimento celular	100
Figura 30: Concentração de glicose, etanol (a), ácido acético e glicerol (b) ao longo do tempo nos ensaios de fermentação em batelada.	101
Figura 31: Relação entre a) concentração de biomassa e concentração de substrato e b) concentração de produto e concentração de substrato. Destacados em vermelho, a região após a fase de latência e respectivo ajuste linear.	101
Figura 32: Crescimento celular médio dos ensaios de fermentação em batelada – Caso 01.	102
Figura 33: Concentração de n-butanol, acetona, etanol e ABE total durante a fermentação – Caso 01.....	102
Figura 34: Variação do pH do meio reacional no decorrer da fermentação - Caso 01	103
Figura 35: Concentração de ácido acético e ácido butírico no decorrer da fermentação – Caso 01.....	103
Figura 36: Crescimento celular médio dos ensaios de fermentação em batelada – Caso 02.	104
Figura 37: Variação do pH do meio reacional no decorrer da fermentação - Caso 02	105
Figura 38: Concentração de ácido acético e ácido butírico no decorrer da fermentação – Caso 02	105
Figura 39: Concentração de n-butanol, acetona, etanol e ABE total durante a fermentação – Caso 02.....	106
Figura 40: Diagrama de operação da bomba de extração de produto a vácuo, onde o valor "0" corresponde a desligado e "1" corresponde a ligado.	108

Figura 41: Crescimento celular da operação do fermentador com aplicação de vácuo.	109
Figura 42: Concentração de glicose, etanol (a), ácido acético e glicerol (b) ao longo do tempo nos ensaios de fermentação em batelada com aplicação de vácuo intermitente.....	110
Figura 43: Diagrama de equilíbrio de fases para a mistura binária etanol-água a pressão constante 0,116 bar, gerado pelo software Aspen Plus 8.6, utilizando o modelo de coeficiente de atividade NRTL e a equação de estado RK.	110
Figura 44: Diagrama de operação da bomba de extração de produto a vácuo, onde o valor "0" corresponde a desligado e "1" corresponde a ligado.	113
Figura 45: Crescimento celular da operação do fermentador com aplicação de vácuo.	114
Figura 46: Crescimento celular da operação do fermentador com aplicação de vácuo.	115
Figura 47: Concentração de ácido acético e ácido butírico no decorrer da fermentação com aplicação de vácuo intermitente.	115
Figura 48: Concentração de n-butanol, acetona, etanol e ABE total durante a fermentação com aplicação de vácuo intermitente.	116
Figura 49: Diagrama de operação da bomba de extração de produto a vácuo, onde o valor "0" corresponde a desligado e "1" corresponde a ligado.	119
Figura 50: Crescimento celular da operação do fermentador com aplicação de vácuo. Disponível apenas da primeira replicata.	120
Figura 51: Concentração de glicose, etanol (a), ácido acético e glicerol (b) ao longo do tempo nos ensaios de fermentação em semi-batelada com aplicação de vácuo intermitente.....	120
Figura 52: Diagrama de ocupação para o caso da operação para a Fermentação do caso 2.A (caso limitante para operação com vácuo).....	127
Figura 53: Sistema soxhlet para realizar a extração de material não estrutural.	143
Figura 54: Figura esquemática do extrator soxhlet. A. zona areada, B: zona intermediária (sujeita a flutuações do nível de água) e C: zona submersa.	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química de diversas espécies de eucalipto.....	29
Tabela 2: Relação de diversas tecnologias utilizadas em pré-tratamentos (Kumar et al. 2009)	35
Tabela 3: Índices de cristalinidade para diversas biomassas in natura ou após pré-tratamentos específicos.....	39
Tabela 4: Composição do meio YPD - sólido e líquido	63
Tabela 5: Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental	71
Tabela 6: Resultados do planejamento experimental	72
Tabela 7: Rendimento em glicose do processo pré-tratamento/hidrólise enzimática para os pontos do planejamento experimental.....	75
Tabela 8: Ensaios da etapa de triagem - Condições de Pré-tratamento ácido, Deslignificação, Hidrólise enzimática e concentração de glicose após hidrólise.....	80
Tabela 9: Análise composicional após cada etapa do processo de pré-tratamento de eucalipto	82
Tabela 10: Valores dos vales e picos do difratograma, índice de cristalinidade do eucalipto e do bagaço de cana de açúcar	83
Tabela 11: Composição dos licores provenientes do pré-tratamento e hidrólise enzimática.	86
Tabela 12: Composição do meio sintético utilizado no pré-inóculo	90
Tabela 13: Composição do meio TGY (Mariano, Qureshi, et al. 2012).....	93
Tabela 14: Composição dos meios de fermentação utilizados.....	94
Tabela 15: Composição da solução tampão.....	94
Tabela 16: Composição da solução de vitaminas	94
Tabela 17: Composição da solução de minerais.....	94
Tabela 18: Balanço de massa para o componente etanol no ensaio de extração	97
Tabela 19: Parâmetros do modelo ajustado aos dados experimentais de crescimento celular.....	99
Tabela 20: Concentração final, produtividade e rendimento dos solventes obtidos na fermentação ABE - Caso 01	104
Tabela 21: Concentração final, produtividade e rendimento dos solventes obtidos na fermentação ABE - Caso 01	106
Tabela 22: Caracterização volume, composição e massa de produto no reator, balão e armadilha nos tempos inicial e final de fermentação	112
Tabela 23: Parâmetros de fermentação obtidos nos ensaios de fermentação batelada com aplicação de vácuo.	112
Tabela 24: Caracterização volume, composição e massa de produto no reator, balão e armadilha nos tempos inicial e final de fermentação.	117
Tabela 25: Parâmetros de fermentação obtidos nos ensaios de fermentação batelada com aplicação de vácuo.	118

Tabela 26: Caracterização volume, composição e massa de produto no reator, balão e armadilha nos tempos inicial e final de fermentação.	121
Tabela 27: Parâmetros de fermentação obtidos nos ensaios de fermentação batelada com aplicação de vácuo.	122
Tabela 28: Hipóteses adotadas no cálculo do número de reatores necessários no processamento do hidrolisado.....	124
Tabela 29: Condições operacionais dos casos para os quais serão estimados o número de reatores	124
Tabela 30: Número de reatores para os casos avaliados	126
Tabela 31: Fator de conversão estequiométricos polímero - monômero para as principais frações de biomassa.	149
Tabela 32: Reagentes e quantias necessárias para a produção do reagente DNS	151

Sumário

Capítulo 01 - Introdução.....	19
1.1 Motivação.....	19
1.2 Objetivos.....	22
1.2.1 Objetivos Gerais.....	22
1.2.2 Objetivos Específicos	22
1.3 Produção Bibliográfica.....	23
1.4 Organização do trabalho	24
1.5 Principais contribuições.....	25
Capítulo 02 - Revisão Bibliográfica	26
2.1 A indústria do eucalipto	26
2.2 Biomassa Lignocelulósica	27
2.3 Biorrefinaria	30
2.4 Plataformas de obtenção de açúcares celulósicos	31
2.5 Pré tratamento	32
2.6 Hidrólise.....	37
2.7 Plataformas de conversão de açúcares em químicos	40
2.8 Processos de fermentação.....	42
2.9 Intensificação de Processos	45
2.10 Considerações finais.....	48
Capítulo 03 - Preparo e caracterização da biomassa, enzimas e microrganismos	50
3.1 Introdução.....	50
3.2 Caracterização da Biomassa.....	50
3.2.1 Biomassa.....	51
3.2.2 Preparo da Matéria-Prima.....	51
3.2.3 Procedimento experimental – caracterização física e química da biomassa	52
3.2.4 Resultados da caracterização física e química do eucalipto.	54
3.3 Caracterização dos coquetéis enzimáticos.....	56
3.3.1 Coquetéis Enzimáticos	57
3.3.2 Procedimento Experimental.....	57
3.3.3 Resultados da atividade enzimática	59

3.4	Cultura de microrganismos	62
3.4.1	Microrganismos.....	62
3.4.2	Manutenção e ativação dos microrganismos.....	62
Capítulo 04 - Ensaio de pré-tratamento e hidrólise enzimática		64
4.1	Introdução	64
4.2	Procedimento Experimental	64
4.2.1	Memorial de cálculo.....	64
4.2.2	Materiais e Métodos.....	67
4.2.3	Análise das amostras.....	70
4.3	Planejamento Experimental	71
4.4	Triagem	75
4.5	Caracterização das correntes de processo	82
4.6	Produção em Biorreator e Caracterização	83
4.6.1	Produção.....	84
4.6.2	Caracterização do Licor.....	84
4.7	Considerações Finais	85
Capítulo 05 - Ensaio de Fermentação		87
5.1	Introdução	87
5.2	Procedimento experimental	87
5.2.1	Produção de Etanol.....	87
5.2.2	Produção de ABE.....	88
5.2.3	Análise dos resultados.....	89
5.3	Definição do meio de cultura e tempos de reação	89
5.3.1	Produção de Etanol.....	89
5.3.2	Produção de ABE.....	92
5.4	Ensaio de Extração	94
5.4.1	Extração de Etanol.....	95
5.4.2	Extração de ABE.....	97
5.5	Fermentação Batelada	98
5.5.1	Produção de Etanol.....	98
5.5.2	Produção de ABE.....	102
5.6	Fermentação batelada com aplicação de vácuo intermitente	108
5.6.1	Produção de Etanol.....	108

5.6.2	Produção de ABE	113
5.7	Fermentação etanólica semi-batelada com aplicação de vácuo intermitente.....	117
5.8	Flexibilização do processo de fermentação	123
5.9	Considerações finais	128
Capítulo 06	– Considerações Finais.....	129
6.1	Conclusões.....	129
6.2	Sugestões de trabalhos futuros	130
Referências Bibliográficas	132
Anexos	140

Capítulo 01 - Introdução

1.1 Motivação

A diversificação do portfólio de produtos é uma estratégia adotada por diversas empresas para evitar o impacto negativo que flutuações de mercado podem acarretar nos indicadores de desempenho econômico, dentre outros motivos (Hitt et al. 2002). A adoção desta estratégia tem sido presente na agroindústria e provocado mudanças radicais em seu modo de operação. Por exemplo, em 2005, o setor sucroalcooleiro brasileiro, que enfrentava problemas com a iminência do colapso nacional do abastecimento de energia elétrica, passou a gerar a partir do bagaço de cana de açúcar e exportá-la (UNICA 2012). Em 2014, o bagaço já compunha 5,2% da matriz elétrica nacional (MME 2015).

Ainda no setor agroindustrial, outra onda de diversificação de portfólio em andamento é o surgimento de tecnologias de conversão de biomassa celulósica a produtos químicos, como o etanol e butanol. Desde 2014, sete unidades industriais de produção de etanol celulósico surgiram pelo mundo, sendo duas destas brasileiras (BiofuelsDigest 2014). Um setor que está dando claros sinais de que os produtos de biorrefinarias comporão seu portfólio no médio prazo é o de papel e celulose. Em 2012, a Fibria anunciou a aquisição de parte da empresa canadense Ensyn, detentora de tecnologia para a produção de óleo de pirólise, e planeja a instalação de plantas de pirólise anexas às suas unidades fabris (ValorEconômico 2016). A americana Green Biologics aponta interesse em investir na produção de n-butanol a partir de biomassa florestal no Brasil (BiofuelsDigest 2016). Desta forma, espera-se que o setor de papel e celulose passe a atuar como produtor de outras substâncias químicas, como etanol e butanol, caracterizando-se como uma biorrefinaria.

O volumoso e consolidado mercado de etanol no Brasil contribuiu para a publicação de extensa literatura acerca de sua produção a partir de materiais lingocelulósicos (Carvalho et al. 2015; Dias et al. 2013; Martin-Sampedro et al. 2014). O butanol, com um volume de mercado de três milhões de litros anuais, apresenta-se como substância de alto interesse, pois se mistura com a gasolina em qualquer proporção, possuem densidade energética equiparável e, se comparado ao etanol, é menos volátil, explosivo, corrosivo e higroscópico que o etanol (Qureshi & Ezeji 2008). No entanto, sua produção a partir de rotas biológicas ainda apresenta entraves técnicos a serem resolvidos para que o processo industrial seja economicamente viável.

A produção de butanol via fermentação batelada convencional raramente ultrapassa concentrações de 13 gL^{-1} devido à limitação que o próprio produto causa ao metabolismo do microrganismo por conta de sua toxicidade (inibição pelo produto) (Qureshi & Ezeji 2008). Esta baixa concentração implica na necessidade de um elevado consumo de vapor na etapa de purificação do produto, bem como em uma elevada produção de efluentes líquidos (80 litros de vinhaça por litro de butanol) que deverá ser tratado antes de deixar os limites de bateria industrial (Mariano, Filho, et al. 2012). Uma solução tecnológica para este problema é a intensificação de processos, combinando duas ou mais operações unitárias. Especificamente neste caso, integram-se as etapas de fermentação e recuperação de produtos, eliminando-se o efeito de inibição do butanol e permitindo o uso de caldos de fermentação mais concentrados (Huang et al. 2015). Além disso, por haver uma quantidade menor de efluentes a ser tratada, espera-se um menor consumo de energia, fato visado por qualquer indústria. Portanto, o desenvolvimento de bioprocessos intensificados, como um processo fermentativo com extração de produtos integrada, pode ser considerado um dos pontos-chaves para a viabilização técnico-econômica da produção de químicos como o butanol em biorrefinarias anexadas às fábricas de celulose.

Estudos propõem ações para remover o butanol do meio reacional a fim de reduzir seus efeitos inibitórios por diversos mecanismos. Por exemplo, trabalhos indicam que é possível manter as concentrações de butanol no meio reacional próximas 6 gL^{-1} convertendo de parcela do álcool a ácido butírico, seguida de uma esterificação a butanoato de butila e extração *in situ* com hexadecano (van den Berg et al. 2013). O produto pode, então, ser utilizado para o enriquecimento de diesel. No entanto, se o produto desejado for o butanol, seria necessário reverter ambas as reações. Em outro estudo, fermentou-se resíduo urbano para a produção de acetona, butanol e etanol (ABE) e compararam uma fermentação batelada com a aplicação de vácuo intermitente para a extração do produto (Huang et al. 2015). A produtividade de ABE aumentou de $0,41 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ para $0,49 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Alternativamente, mostrou-se também que extração via dessorção (*gas stripping*) pode levar a produtos com concentrações de até 120 gL^{-1} a partir de soluções sintéticas de açúcar (Qureshi & Blaschek 2000). Apesar da existência de estudos indicando que a remoção a vácuo do produto é uma solução eficiente e intensiva (pois a extração ocorre no reator), não foram encontradas publicações sobre o uso desta tecnologia em fermentações que usam cavacos de eucalipto como substrato visando à flexibilidade entre diversos produtos, como ABE e etanol simultaneamente.

Deste modo, este projeto de pesquisa de caráter exploratório tem como enfoque avaliar a produção flexível de ABE produzido pelo metabolismo do microrganismo *Clostridium beijerinckii* e etanol apenas, pelo microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*. Para tanto, avaliou-se a fermentação de meios de complexos produzidos a partir de cavacos de eucalipto pré-tratados e hidrolisados. Os cavacos de eucalipto foram gentilmente fornecidos pela empresa parceira Fibria Celulose S/A e as hidrólises foram feitas por rota enzimática, usando-se do coquetel enzimático Celic CTec 2 da empresa parceira Novozymes. Avaliou-se também a aplicação de vácuo intermitente durante a fermentação para que haja remoção de produto e verificar qual é o impacto em rendimento e produtividade de etanol e ABE.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivos Gerais

Dentro do contexto apresentado e com uma abordagem sistêmica, o objetivo desse projeto exploratório é compreender a utilização de um único reator visando produção flexível de butanol/etanol integrado a uma usina Kraft de celulose, como uma proposta de flexibilização do portfólio do setor. O principal desafio consiste no desenvolvimento de uma tecnologia de fermentação que ao mesmo tempo em que seja intensificada (extração do produto via vácuo) também seja flexível (produção de etanol ou ABE).

1.2.2 Objetivos Específicos

Determinar condições de preparo do substrato: o primeiro objetivo deste trabalho é determinar quais são as melhores condições de pré-tratamento e deslignificação que resultam em um maior rendimento na obtenção de açúcares monoméricos após a hidrólise enzimática, quantificando os inibidores, como furfural, 5-hidroxi-metil-fulfural (5-HMF) e ácido acético, e assegurando-se sem que a produção de inibidores de fermentação seja elevada.

Verificar a eficiência de fermentação extrativa: neste trabalho, busca-se comparar a fermentação de cavacos de eucalipto hidrolisado com e sem a aplicação de vácuo intermitente para a produção de etanol (microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*) e para a produção de acetona, butanol e etanol (microrganismo *Clostridium acetobutylicum*). Será validada se a aplicação de vácuo é uma estratégia adequada para a redução dos efeitos de inibição do produto nos microrganismos.

Eleger melhor configuração de fermentadores: com base nas conclusões dos objetivos anteriores, propor uma configuração de fermentadores e um diagrama de ocupação que resulte em um número mínimo de fermentadores e comprar os casos batelada com e sem aplicação de vácuo.

1.3 Produção Bibliográfica

Durante o programa de mestrado, foram geradas as seguintes publicações:

Trabalhos apresentados em congressos

- ASSUMPÇÃO, D.C.; PEREIRA, G.C.Q.; GIRALDI, L.A.; CERVI, W.R.; MARIANO, A.P. *Techno-economic analysis of Jet fuel production from ethanol in first and second generation sugarcane biorefineries*. COBEQ – Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 21^a edição, 2016, Fortaleza (CE), Brasil.
- ASSUMPÇÃO, D.C.; CARVALHO, C.D.; MARIANO, A.P. *Avaliação do uso pedagógico e de serviços técnicos de uma planta piloto de produção de biodiesel em unidades de ensino de engenharia química*. ENBEQ – Congresso Brasileiro de Ensino em Engenharia Química, 16^a edição, 2016, Fortaleza (CE), Brasil.
- LOPES, E.S.; ASSUMPÇÃO, D.C.; TOVAR, L.P.; MARIANO, A.P.; MACIEL FILHO, R. *Comparison between sugarcane bagasse and eucalyptus hydrolysates for fermentation: promising biomass for ethanol 2G production*. Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 39^a edição, São Francisco (CA), Estados Unidos da América.

Resumos publicados em anais de congressos

- PEREIRA, G.C.Q., ASSUMPÇÃO, D.C., MACIEL FILHO, R., EZEJI, T., MARIANO, A.P., *Development of a bioprocess with high energy efficiency for the flexible production of n-butanol/ethanol integrated to a kraft pulp mill*. Nordic Wood Biorefinery Conference, 7^a edição, Estocolmo, Suécia. ISBN 978-91-86018-20-7

Artigos completos a serem submetidos em periódicos:

- ASSUMPÇÃO, D.C., MACIEL FILHO, R., MARIANO, A.P. *Development of a bioprocess with high energy efficiency for the flexible production of n-butanol/ethanol integrated to a kraft pulp mill*.

Capítulos de livros a serem publicados (já aceito):

- ASSUMPÇÃO, D.C.; HAMAGUCHI, M.; ROCHA, J.D.; MARIANO, A.P. Chapter 25. *Green energy in South America, Africa and Asia*. VERTÈS, A.A.; QURESHI, N.; BLASHECK, H.P.; YUKAWA, H. *Green energy to sustainability: strategies for global industries*. John Wiley & Sons Ltd.

1.4 Organização do trabalho

Esta dissertação de mestrado está dividida em seis capítulos e seus anexos constam a maioria dos procedimentos experimentais utilizados. O Capítulo 01 introduz o assunto da dissertação, mostrando as motivações do estudo e suas contribuições. O Capítulo 02 apresenta uma vasta revisão bibliográfica que fornecem a base para o entendimento dos conceitos aplicados experimentalmente, motivação do trabalho e qual é o estado da arte das tecnologias de intensificação de processos fermentativos.

No Capítulo 03, caracterizam-se química, física e biologicamente os principais insumos utilizados neste trabalho: biomassa, enzimas e microrganismos. O Capítulo 04 tem como enfoque o estudo da transformação de algumas das frações da biomassa lignocelulósica em seus constituintes básicos, majoritariamente carboidratos simples, que serão fermentados em etapas posteriores.

O Capítulo 05 analisa a fermentação do substrato produzido no capítulo anterior por dois microrganismos distintos: *Saccharomyces cerevisiae* e *Clostridium beijerinckii*. Avalia-se a fermentação em diversos regimes de fermentação e, por fim, faz-se um estudo da flexibilização de um processo fermentativo entre os dois microrganismos. O Capítulo 06 encerra o presente trabalho, mostrando as principais conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

1.5 Principais contribuições

Com este trabalho, consolidou-se o estudo para a formação de biorrefinarias baseadas na indústria Kraft. Foram obtidos rendimentos do processo de conversão de cavacos de eucalipto em açúcares e, por sua vez, em produtos de fermentação.

Este é o primeiro estudo encontrado que estuda experimentalmente a flexibilização do processo de produção de etanol e butanol a partir de eucalipto, utilizando-se a tecnologia de fermentação a vácuo. O atual trabalho corresponde a um dos principais marcos de pesquisa do projeto FAPESP 2015/07097-5.

Capítulo 02 - Revisão Bibliográfica

2.1 A indústria do eucalipto

A indústria florestal apresenta uma importante função econômica, social e ambiental para o Brasil. Mesmo diante de uma retração do PIB do setor industrial de 1,2%, o setor da indústria florestal cresceu 1,7% em 2014, contribuindo para a geração de empregos. Abrangendo áreas de 7,74 milhões de hectares (0,9% do território nacional), o setor é responsável por 91% de todas as árvores produzidas, sendo o restante oriundo de extrativismo vegetal legal. Desta área, 5,56 milhões de hectares são destinados à produção de eucalipto, divididos principalmente entre os estados de Minas Gerais (25,2%), São Paulo (17,6%) e Mato Grosso do Sul (14,5%) (IBÁ 2015).

O Brasil é o quarto maior produtor de celulose no mundo, atrás dos Estados Unidos, China e Canadá, com uma produção de 16,46 milhões de toneladas no ano de 2014. Apesar do crescimento da produção de celulose – inclusive devido à elevada produtividade brasileira comparada a outras nações – a produção de papel apresentou queda devido à retração do mercado doméstico e exportação deste produto. Existe uma clara tendência da migração da celulose destinada à produção de papel, que segue em queda principalmente devido ao crescimento da mídia digital, a outros produtos com maior valor agregado de mercado (IBÁ 2015).

Neste contexto, a exploração de biomassas lignocelulósicas (e de suas frações além da celulose) se faz interessante, não só por utilizar uma matéria-prima que apresenta indícios queda na demanda, mas também porque permite a produção de substâncias utilizando fontes renováveis.

2.2 Biomassa Lignocelulósica

Biomassa é toda matéria orgânica, seja de origem animal ou vegetal, que pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de combustíveis e, portanto, encarada como potencial fonte de energia (Kelman 2008). Dentre elas, destaca-se a biomassa lignocelulósica, pois não possui um destino alimentar como biomassa animal ou biomassas ricas em amido ou glicose. As biomassas lignocelulósicas possuem componentes comuns, como a celulose, hemicelulose, lignina, dentre outros minoritários e são arranjados conforme ilustrado pela Figura 1.

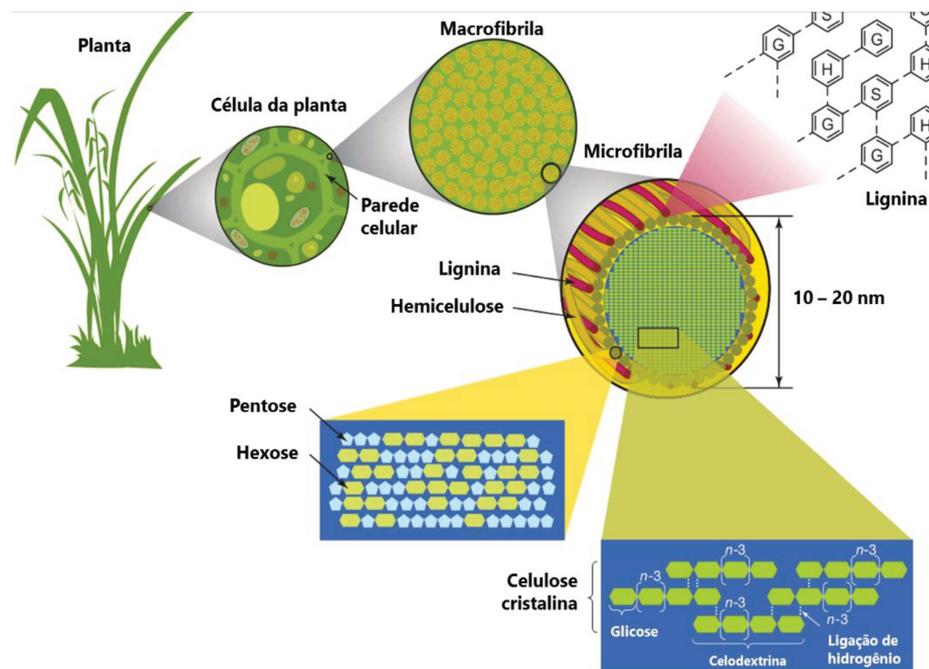


Figura 1: representação da estrutura vegetal da parede celular secundária de uma biomassa lignocelulósica típica. Adaptado - (Rubin 2008)

As cadeias de celulose apresentam-se de modo ordenado ao longo da fibra vegetal e possuem cristalinidade inerente (Nelson & Cox 2011). Envolvendo as cadeias de celulose, apresenta-se a lignina, uma complexa macromolécula composta majoritariamente por anéis aromáticos cuja função é primordialmente a proteção da estrutura vegetal. A ligação entre a celulose e lignina é feita pela hemicelulose, um polímero formado principalmente por pentoses (Bidlack et al. 1992).

Esta estrutura bioquímica foi desenvolvida evolutivamente por ser resistente a ataques de microrganismos e por conferir grande proteção às cadeias de celulose. Industrialmente, no entanto, existe um grande interesse nas frações protegidas pela lignina, por se tratarem de polissacarídeos hidrolisáveis a carboidratos e convertidos *a posteriori* a outras substâncias químicas, seja por rotas químicas, seja por rotas biológicas (Cherchi *et al.*, 2011). Conforme ilustrado pela Figura 2, a celulose é um polímero de glicoses. Já a hemicelulose é um polímero composta majoritariamente por pentoses, mas também por hexoses e ácidos orgânicos.

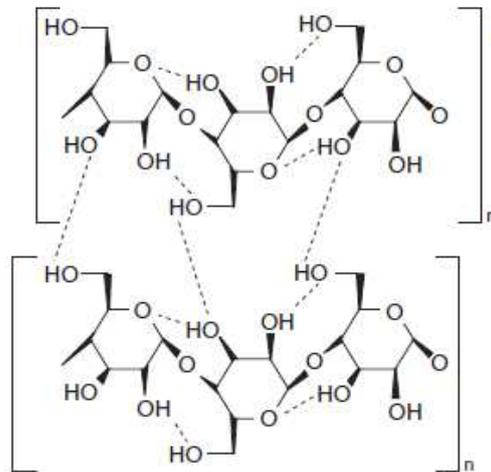


Figura 2: Estrutura química da celulose e ilustração das ligações de hidrogênio presentes na molécula (Nelson & Cox 2011).

Apesar a estrutura vegetal ser comum às biomassas lignocelulósicas, existem peculiaridades para cada espécie vegetal, principalmente no que resguarda a composição química. Por exemplo, o eucalipto apresenta maiores quantidades de holocelulose (celulose e hemicelulose), indicando um maior potencial na produção de substâncias a partir destes carboidratos (Figura 3). No entanto, um maior teor de lignina significa a necessidade de tratamentos industriais mais severos e, tipicamente, mais dispendiosos.

Diversos estudos quantificam a composição química do eucalipto para uma melhor compreensão da operação unitária ou processo químico a que este é submetido. A composição química de algumas espécies é apresentada na Tabela 1.

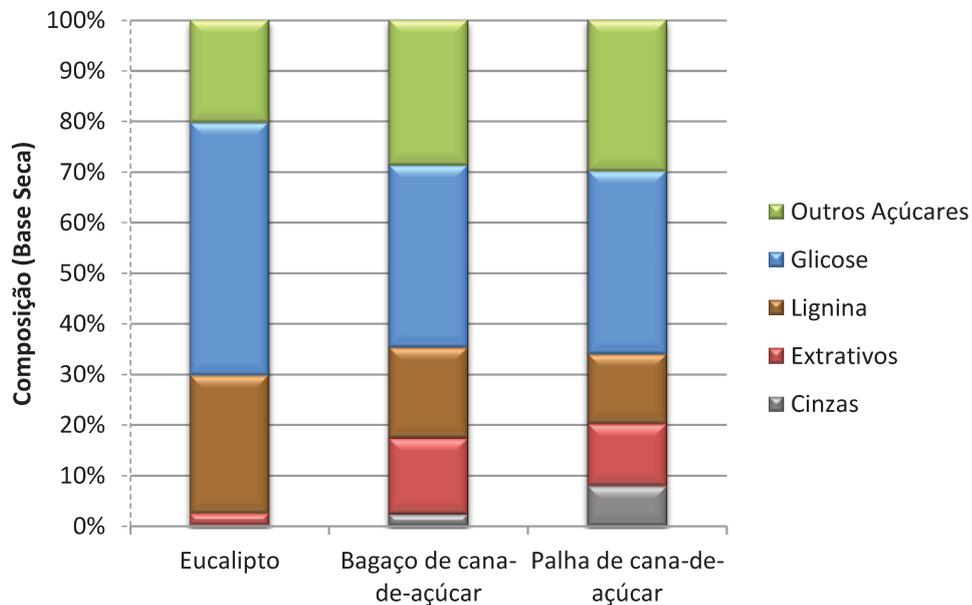


Figura 3: Composição química do cavaco de eucalipto, bagaço de cana-de-açúcar e palha de cana-de-açúcar (Carvalho et al. 2015).

Tabela 1: Composição química de diversas espécies de eucalipto.

Espécie	Origem	Celulose	Xilanas	Lignina	Extrativos	Cinzas	Autor
<i>Eucalyptus globulus</i>	Pontevedra, Espanha	44.4%	16.0%	24.7%	3.0%	0.2%	(Romaní et al. 2012)
<i>Eucalyptus sp.</i>	Fujian, China	42.6%	19.6%	28.3%	3.0%	0.9%	(Wei et al. 2012)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Concepción, Chile	47.2%	16.0%	22.1%	2.7%	---	(Muñoz et al. 2011)
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Curvelo, Brasil	47.6%	22.1%	30.3%	2.8%	0.2%	(Pereira et al. 2013)
<i>Eucalyptus urophylla</i>	João Pinheiro, Brasil	48.4%	21.9%	29.7%	2.7%	0.1%	(Carvalho et al. 2015)

A possibilidade de aproveitamento das diversas frações da biomassa para a produção de uma gama de produtos passa a ser de atrativo para a indústria de celulose. A diversificação do portfólio de produtos é interessante em um cenário no qual as tecnologias de segunda geração surgem em escala industrial aliado com a possível estagnação do mercado de celulose. Em outras palavras, a estrutura industrial de uma biorrefinaria apresenta-se como uma tendência para as indústrias de papel e celulose.

2.3 Biorrefinaria

Duas definições amplamente utilizadas sobre biorrefinaria foram formuladas pela Agência Internacional de Energia e pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável:

"Biorrefinamento é o processamento sustentável de biomassa em uma gama de produtos comercializáveis e energia." - (IEA 2014)

"A biorrefinaria é uma unidade que integra processos de conversão de biomassa para a produção de combustíveis, energia e químicos." - (NREL 2009)

Estas duas definições representam bem o futuro próximo do setor de papel e celulose. Além da polpa de celulose e do papel, a indústria passaria a produzir outros produtos químicos como etanol, butanol, acetona, ácidos orgânicos, aldeídos, gás de síntese etc. Alguns destes produtos (etanol, por exemplo) são caracterizados como *commodities*, por possuírem grande demanda no mercado, mas um baixo valor agregado. Já outros produtos como ácidos orgânicos, butanol, bio-óleo (Papari & Hawboldt 2015) possuem uma demanda mundial menor que o etanol (em ordens de grandezas), mas um valor agregado superior. Alguns possíveis produtos de biorrefinaria são apresentados na Figura 4.

Esta composição de portfólio é também observada nas refinarias de petróleo. Em 2014, por exemplo, a produção de produtos energéticos totalizaram 130,2 milhões de m³ enquanto a produção de não energéticos foi de 17,4 milhões de m³ no Brasil. No entanto, os preços de venda dos produtos não energéticos são maiores, fazendo destes os responsáveis pela margem de lucro das refinarias, enquanto os energéticos ditam a capacidade produtiva da unidade fabril (ANP 2016).

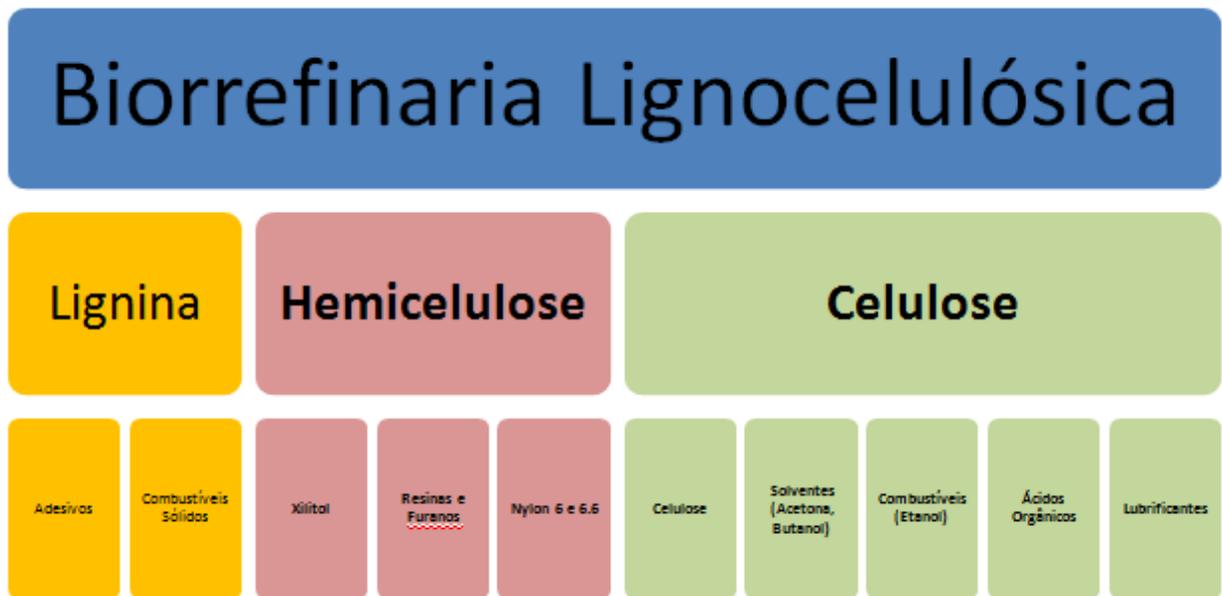


Figura 4: Possíveis produtos de uma biorrefinaria lignocelulósica. Adaptado de (Kaam & Gruber 2006)

A expansão da produção de plantas Kraft – que deve seguir este modelo das petroquímicas – apresentam, no entanto, dois relevantes problemas. O primeiro deles é a saturação de disponibilidade energética que a indústria possui. A moderna indústria de papel e celulose produz a energia necessária para seu funcionamento e uma expansão implicaria em aumentar esta demanda sem aumentar a oferta de energia. Outra necessidade seria tornar o processo flexível para a produção de diversos produtos, como ocorre na indústria petroquímica. Uma possível solução para estes seria o desenvolvimento de um processo intensivo, com baixa demanda energética e que diversifique o portfólio de produtos a partir de uma matéria prima – o eucalipto (e suas frações de celulose e hemicelulose, ricas em açúcares em forma polimérica).

2.4 Plataformas de obtenção de açúcares celulósicos

A obtenção dos açúcares celulósicos (também chamados de açúcares de segunda geração) em escala industrial é um feito recente, datando de 2013 (Beta Renewables 2013), e a indústria ainda é muito jovem para que haja um consenso de qual tecnologia é a mais rentável economicamente. As tecnologias para

a obtenção de açúcares celulósicos são constituídas por duas etapas principais: o pré-tratamento e a hidrólise. O pré-tratamento é a etapa na qual a estrutura vegetal é desconstruída, buscando ter-se acesso à celulose e hemicelulose, sem que haja sua degradação (Mosier et al. 2005). A hidrólise consiste na transformação química dos polímeros naturais em seus constituintes monoméricos principais, a glicose e a xilose. Apesar de a hidrólise química ser possível, as indústrias convergiram para a hidrólise enzimática, devido às condições brandas de operação, um tratamento de efluentes menos dispendioso e uma metalurgia mais simples dos equipamentos. Materiais lignocelulósicos requerem pré-tratamentos agressivos para que haja um produto facilmente hidrolisável por enzimas (Agbor et al. 2011).

2.5 Pré tratamento

Conforme mencionado na seção anterior, o objetivo do pré-tratamento é romper a estrutura da lignina, separando-a das demais frações da biomassa, e mitigar o caráter cristalino da celulose, conferindo maior acessibilidade às enzimas durante a etapa de hidrólise (Mosier et al. 2005). Apesar da ampla gama de pré-tratamentos existentes, deve-se atentar a algumas características chave para escolher qual seria o melhor processo (Chandra et al. 2007), como:

- Alta compatibilidade da tecnologia com uma grande diversidade de biomassas. Diferentes biomassas requerem diferentes pré-tratamentos devido a sua estrutura biomolecular;
- Baixo custo de capital e custo de operação;
- Baixo consumo de agente de pré-tratamento (catalisador), permitindo elevadas cargas de biomassa;
- Altos índices de recuperação das frações da biomassa e sua manutenção em uma estrutura aproveitável;

- Necessidade de etapas de preparo e pré-condicionamento da biomassa antes do pré-tratamento;
- Baixa demanda de energia ou ser construída permitindo integração energética;
- Baixa degradabilidade dos carboidratos e lignina, que leva a formação de produtos de inibição a subseqüentes etapas de hidrólise enzimática e fermentação.

Este último tópico é de grande importância no estudo de tecnologias de pré-tratamento. Alguns processos utilizam condições de operação excessivamente agressivas à biomassa, não apenas desestruturando, mas degradando carboidratos simples a outras substâncias, conforme ilustrado na Figura 5. Apesar dos produtos de degradação possuírem importância econômica, eles apresentam caráter inibitório a processos biológicos (catalisados por enzimas e/ou microrganismos) (Modenbach & Nokes 2012).

A fim de se quantificar a severidade de um dado pré-tratamento, parte-se da definição de fator de severidade combinado - R'_0 , um parâmetro que considera as variáveis de processo tempo (t, em min), temperatura (T, em °C) e pH (Chum et al. 1990):

$$\log R'_0 = \log \left[t \cdot e^{\left(\frac{T-100}{14,75} \right)} \right] - pH$$

Este parâmetro, no entanto, deve ser utilizado com cautela, pois não representa com precisão a real severidade do processo. Sendo assim, deve ser utilizado para estimativas superficiais (Galbe & Zacchi 2007). Por tanto, a avaliação do pré-tratamento deve levar em conta outros parâmetros (Agbor et al. 2011), como:

- I. Liberação de carboidratos em sua forma monomérica e oligomérica na fase líquida;
- II. Hidrólise enzimática da fração sólida, levada e não lavada;

- III. Fermentação do líquido obtido no pré-tratamento tal qual ou diluído, para avaliar o efeito de inibição em microrganismos;
- IV. Fermentação da fração sólida após hidrólise, pelos mesmos motivos.
- V. Avaliação do potencial biotecnológico do pré-tratamento. Por exemplo, pré-tratamentos com amônia, ácido sulfúrico ou fosfórico podem trazer macronutrientes (N, S e P respectivamente) para a etapa de fermentação.

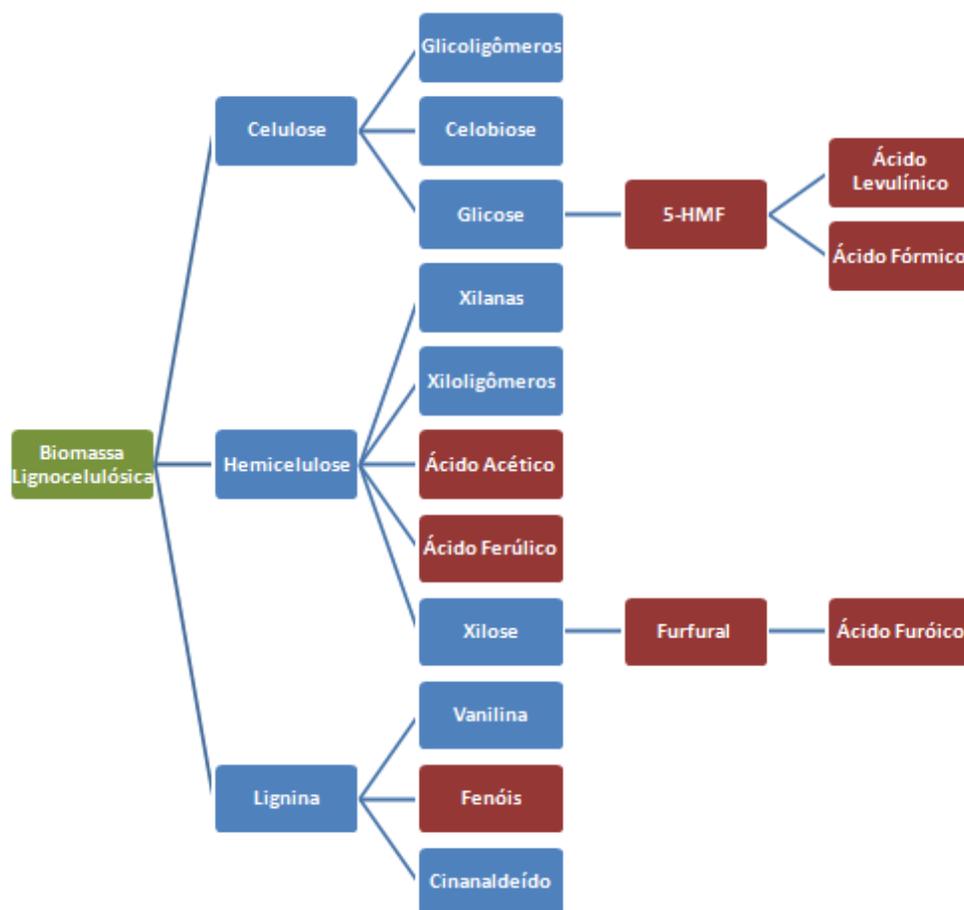


Figura 5: Diagrama mostrando alguns produtos e potenciais produtos de degradação formados a partir das frações de celulose, hemicelulose e lignina durante pré-tratamento. Em vermelho são indicados os principais inibidores de atividades microbianas. Adaptado (Modenbach & Nokes 2012)

Diversas tecnologias de pré-tratamento vem sendo estudadas, buscando-se compreender qual é a mais adequada para cada biomassa, inclusive cavacos de eucalipto (Carvalho et al. 2015; Martin-Sampedro et al. 2014). Na Tabela 2 são

apresentadas algumas tecnologias de pré-tratamento, bem como suas vantagens e desvantagens.

Tabela 2: Relação de diversas tecnologias utilizadas em pré-tratamentos (Kumar et al. 2009)

Processo de Pré-Tratamento	Vantagens	Desvantagens
Fragmentação mecânica	Reduz a cristalinidade da celulose	Consumo energético geralmente superior a energia inerente a biomassa
Explosão a Vapor	Ataca a hemicelulose e transforma a lignina. Economicamente rentável	Destruição de uma porção de xilanas, fragmentação incompleta da matriz lignina-carboidrato, gera compostos inibitórios ao microrganismo
Explosão de Fibra com Amônia (AFEX)	Aumenta a área superficial, remove lignina e parcela da hemicelulose	Ineficiente com biomassas com alto teor de lignina
Hidrólise Ácida	Hidrolisa a hemicelulose a xilose a outros açúcares, afeta a estrutura da lignina	Custo elevado, corrosão de equipamentos, formação de substâncias tóxicas aos microrganismos
Hidrólise Alcalina	Remove a hemicelulose e lignina, aumenta a área superficial da fibra	Requer longos tempos de residência, sais irre recuperáveis são formados e incorporados a biomassa
Organosolv	Hidrolisa a lignina e hemicelulose	O solvente precisa ser drenado do reator, evaporado, condensado e reciclado. Custo elevado
Biológico	Degrada lignina e hemicelulose, baixo consumo energético	Cinética de hidrólise muito lenta

Uma diversidade de pré-tratamentos já foram testados com cavacos de eucalipto e os resultados são divulgados na literatura. Autores avaliaram o uso da tecnologia organosolv em eucalipto da espécie *E. globulus* (Yáñez-S et al. 2013). O eucalipto, previamente moído, foi tratado com solução etanol/água (30:70 em massa), com teor de sólidos 1:6 (massa de biomassa/volume de solução), a temperaturas variando entre 190 °C e 200 °C e tempo variando entre 15 e 75 min. A polpa obtida foi hidrolisado com enzimas com complexo das celulasas, com teor de

sólidos de 10% e 15% e carga enzimática variando entre 10 e 30 FPU/g sólido seco. Ao final de 72h, foram obtidas concentrações de 49 g/L e 73 g/L de glicose para os respectivos teores de sólido, que equivalem a conversões de cerca de 60% da celulose na hidrólise.

Estudos vêm sendo conduzidos com líquidos iônicos (Xu et al. 2015), apesar de seu elevado custo. Utilizando-se *E. urophylla* moído, testaram-se 6 tipos de líquidos iônicos a 120 °C, tempo de batelada de 3h e carga de sólidos 6% em base mássica. Posteriormente, foram feitas hidrólises enzimáticas com carga enzimática 20 FPU/g de biomassa seca, 48h de batelada e 2% de carga de sólidos (massa/volume). As conversões de celulose chegam a 90%, mas o controle negativo indica que o eucalipto sem pré-tratamento já apresentava conversão de 75%. Estes elevados valores se devem, provavelmente, a baixa carga de sólidos na hidrólise, eliminando problemas de transferência de massa. Industrialmente, é desejado cargas de sólidos elevadas, para que os custos de operação da etapa de separação sejam menores.

Pré-tratamentos que utilizam apenas água também foram testados. Avaliou-se o pré-tratamento hidrotérmico com temperaturas variando entre 195 °C e 250 °C com diversos tempos de operação e carga de sólidos de 12,5% (massa/volume) (Romaní et al. 2012) e com 100h de hidrólise enzimática com carga de enzimas de 10 FPU/g, alcançando-se 35 g/L de glicose. Avaliou-se também o uso da tecnologia de explosão a vapor aplicada a cavacos de eucalipto, para a produção de ABE (Zheng et al. 2015). Utilizando-se vapor saturado a 230 °C e tempo de residência de 3 min, eucalipto foi processado e a polpa gerada foi hidrolisada enzimaticamente a diversas cargas de sólidos (6,7% a 25,0% massa/volume) e com a elevada carga de enzimas de 175 FPU/mL durante 48h. Hidrolisados com concentrações entre 35 e 85 g/L de glicose foram obtidos.

Pesquisou-se, também, o efeito de pré-tratamento hidrotérmicos, ácidos, alcalinos e combinações entre ácido e alcalino em duas espécies de eucalipto, todos a 120 °C e 1h (Lima et al. 2013). Observou-se que os tratamentos ácidos agridem a

hemicelulose, enquanto os tratamentos alcalinos possuem o menor rendimento em glicose. Concluíram também que a combinação entre as duas abordagens resultaram em um maior rendimento na hidrólise enzimática.

Pré-tratamentos alcalinos aumentam a área superficial da biomassa, pois provocam o inchaço das células, aumentando a acessibilidade das enzimas, enquanto reduzem o grau de polimerização da celulose, além de promover solubilização parcial da lignina. Os pré-tratamentos ácidos, a sua vez, atacam a hemicelulose, que é amorfa e, portanto, suscetível a agentes promotores de hidrólise (Modenbach & Nokes 2012; Galbe & Zacchi 2007).

Apesar da variedade de pré-tratamentos já testados com cavacos de eucalipto, não foram encontrados estudos na literatura que utilizassem peróxido de hidrogênio como agente oxidante, conforme já testado com outras biomassas (Correia et al. 2013). Neste trabalho, serão avaliados agentes de pré-tratamento comumente encontrados em uma indústria Kraft, como ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, pensando no aproveitamento da estrutura de estocagem de químicos.

2.6 Hidrólise

Após a desconstrução da estrutura vegetal pelo pré-tratamento, deve-se hidrolisar os carboidratos às suas formas monoméricas, de modo a obter os açúcares que serão utilizados como substrato para produção das substâncias químicas de interesse.

A hidrólise pode ocorrer catalisada por ácido diluído, geralmente ácido sulfúrico, por ser mais econômico que outros ácidos fortes. Em contrapartida, o processo é realizado a elevadas temperaturas, aumentando a demanda energética da planta, além de requerer metalurgia e tratamento de efluentes adequados a ácidos inorgânicos (Chaturvedi & Verma 2013). Alternativamente (e talvez o único consenso tecnológico entre as indústrias existentes de segunda geração), existe a hidrólise

catalisada por enzimas. Devido à alta especificidade das enzimas, a formação de subprodutos indesejáveis é minimizada (Nelson & Cox 2011).

Modelos clássicos de ação enzimática sugerem que sistemas de enzimas capazes de degradar polissacarídeos são liderados pela ação de enzimas que clivam aleatoriamente a parte interna da cadeia polimérica e posteriormente degradam os oligômeros com enzimas de ação externa (Merino & Cherry 2007).

Para hidrolisar as celuloses e hemiceluloses, deve-se utilizar um coquetel enzimático adaptado para este propósito. As principais enzimas para este processo são as celulasas, endoglucanases, β -glucosidases, entre outras. A faixa de pH e temperatura de operação para estas enzimas é entre 4,5 e 6,0 e próximo a 50 °C, respectivamente. O processo enzimático não requer elevado consumo energético e tampouco uma metalurgia especial. No entanto, o coquetel enzimático possui elevado valor de mercado, sendo um dos principais componentes do custo de operação (Cherchi et al. 2011). Apesar não haver um valor universal, estudos apontam que a dosagem economicamente viável de enzimas celulase deve ser aproximadamente 15 FPU (Filter Paper Units ou Unidades de Filtro de Papel) por grama de biomassa seca (Martin et al. 2012)

Entretanto, existem fatores alheios às condições operacionais que interferem na reação bioquímica catalisada pelo coquetel. Cada enzima ou coquetel possui uma taxa de reação própria, que depende do substrato, da composição do coquetel, da idade do coquetel e das condições operacionais da reação. Esta taxa, dada pela quantidade de matéria de substrato convertida por unidade de coquetel por unidade de tempo, é definida como atividade enzimática, e é uma grandeza de suma importância para definir qual será a carga enzimática (massa de coquetel dividido por massa de biomassa) na etapa da hidrólise. Para cada enzima, há um protocolo diferente a ser utilizado (Poutanen & Puls 1988; Ghose 1987).

Fatores alheios ao coquetel também afetam a capacidade da enzima em converter o substrato (Agbor et al. 2011). Cadeias de polissacarídeos apresentam-se

com um arranjo cristalino, que pode ser mais ou menos compacto para cada biomassa. Um arranjo com muitos sítios cristalinos – ou elevado índice de cristalinidade – pode oferecer resistência à ação enzimática, qualificando a biomassa como recalcitrante (Reese 1955). Apesar do propósito do pré-tratamento também ser eliminar esta característica, muitas vezes este pode não ser suficiente.

Pode-se quantificar o índice de cristalinidade da celulose presente em biomassas a partir da técnica de difração de raios-x (DRX). O valor deste índice permite comparar a recalcitrância entre biomassas, bem como avaliar a mudança da cristalinidade ao longo do processamento da biomassa (Park et al. 2010). Na Tabela 3 são apresentados os índices de cristalinidade para diversas biomassas. Percebe-se que o eucalipto possui um valor relativamente elevado.

Tabela 3: Índices de cristalinidade para diversas biomassas in natura ou após pré-tratamentos específicos

Biomassa	Pré-tratamento	I_{Cr} (%)	Fonte
Eucalipto	In Natura	60.4	(Inoue et al. 2008)
	Hidrotérmico + Moagem	74.4	
	Alcalino	76.8	(Wan et al. 2010)
Álamo	In natura	46.4	(Yang et al. 2012)
	Ácido sulfúrico diluído	48.6	
	Alcalino	32.8	(Yao et al. 2013)
Palha de milho	In natura	52	(S. Zhang et al. 2012)
	Alcalino combinado com extrusão	48	
	Explosão a vapor	43.8	(Liu et al. 2014)
Palha de arroz	In natura	57	(Hsu et al. 2010)
	Ácido sulfúrico diluído	65	
Cana de açúcar	In natura	48	(Lopes 2015)
	Ácido sulfúrico seguido por alcalino	68	
	Ácido sulfúrico seguido por alcalino	66	(Maeda et al. 2011)

Vale ressaltar que além destes fatores citados, outros contribuem com uma baixa conversão na reação de hidrólise, como grau de polimerização da celulose, porosidade do substrato, barreira de lignina, conteúdo de hemicelulose, tamanho da

partícula, espessura da parede celular e inibição enzimática (Alvira et al. 2010; Bezerra & Dias 2005).

Coquetéis enzimáticos não são capazes de converter os carboidratos de biomassa em seus respectivos monômeros por conta própria. É necessária uma combinação adequada biomassa e pré-tratamento para que bons rendimentos de processo sejam alcançados.

Por exemplo, Chiarello e colaboradores estudaram a conversão de cavacos de eucalipto em açúcares celulósicos, utilizando a tecnologia de explosão a vapor e fazendo uma hidrólise com elevado teor de sólidos (20%) e baixa dosagem enzimática (13,3 FPU/g sólido seco) (Chiarello et al. 2016). O coquetel utilizado foi Cellic CTec 3, produto de elevada performance que levou a 125 g/L e glicose após 72h de reação.

2.7 Plataformas de conversão de açúcares em químicos

Uma vez obtidos os açúcares de segunda geração, abre-se um grande leque de produtos que podem ser feitos e comercializados por uma simples unidade industrial. Pela rota catalítica, por exemplo, a empresa *Gruppo Mossi Ghisolfi* patenteou a tecnologia de craqueamento de pentoses via hidrogenação para produzir polióis, dentre eles monoetileno glicol, que é um precursor para a produção de resina PET (M&G Chemicals 2017). Já a rota biológica permite a produção de ácidos orgânicos e alcoóis, como o etanol que, a sua vez, é a substância base para a produção de gás de síntese, butadieno, acetato de etila, ácido acético, acetaldeído, eteno e polietileno, etc (Moulijn et al. 2003).

Apesar do seu potencial químico, o etanol é amplamente utilizado como fonte de energia (combustível) em larga escala desde a década de 70 no Brasil. Seja pela independência de importações de combustíveis fósseis (e diminuição da sujeição à variação do câmbio) (Rosillo-Calle & Cortez 1998), seja pelo seu balanço energético positivo e pegada de carbono inferior a combustíveis fósseis (Goldemberg &

Guardabassi 2009), o etanol tornou-se um combustível de grande importância nos Estados Unidos, Brasil, África Subsaariana e Sudeste Asiático.

Em 2015, o Brasil produziu pouco mais que 30 milhões de m³ de etanol e, até novembro de 2016, este número alcançou quase 28 milhões, sendo responsável por 27,8% da produção mundial, apenas atrás dos Estados Unidos. Este vultoso volume qualifica o etanol como uma *commodity* e o alvo da produção brasileira é majoritariamente o mercado interno. A produção mundial e brasileira vem geralmente aumentando ano após ano (ANP 2017).

No cenário dos biocombustíveis, o n-butanol ou 1-butanol é frequentemente mencionado como um potencial insumo. Apesar da frota brasileira de veículos leves estar adaptada ao uso de etanol como combustível em qualquer proporção com a gasolina, o mesmo não se pode afirmar sobre o restante do mundo. O butanol possui características mais desejadas para combustíveis "*drop-in*", pois possui uma densidade energética superior ao do etanol (29,2 MJ/L frente a 21,2 MJ/L), e mais próximo da gasolina (32,5 MJ/L). Além disso, uma menor pressão de vapor, caráter menos higroscópico, e menor inflamabilidade e corrosividade, o tornariam mais interessante que o etanol, mas limitações no processo de fermentação dificultam sua produção via rota biológica em escala industrial (Mariano et al. 2011; Green 2011; Atsumi & Liao 2008; Yeung & Thomson 2013).

Além de seu potencial como combustível, o butanol é um precursor para diversas outras indústrias. No Brasil, a empresa Elekeiroz é a única produtora de butanol e os principais destinos de seu produto são na confecção de lubrificantes industriais, fabricação de tensoativos (como detergentes), aromas e fragrâncias, indústria de defensivos agrícolas, produção de couro sintético, solventes, tintas e vernizes.

Apesar das pesquisas frequentemente citarem etanol e butanol como competidores, neste trabalho avalia-se os pontos de integração entre uma indústria do setor de papel e celulose que seja capaz de produzir etanol e/ou butanol, a

dependem das condições de mercado. A produção de ambos os produtos via rota bioquímica é muito similar. Além de compartilharem todo o processo de upstream da biomassa, as condições de projeto e processo na fermentação também se assemelham e existem pequenas mudanças a serem feitas na etapa de purificação dos produtos (Moulijn et al. 2003).

Este é um ponto crucial deste estudo. O primeiro problema industrial que se busca atacar com esta pesquisa é a diversificação de portfólio de produtos em uma indústria do setor de papel e celulose. Além dos produtos correntes, a nova biorrefinaria passaria a produzir um importante combustível utilizado em ampla escala, ao passo que produziria também outra substância de grande versatilidade, atendendo diversos mercados. Um diagrama de blocos do processo estudado neste trabalho é apresentado na Figura 6. O empecilho para a diversificação, no entanto, reside no fato de que a fermentação para a produção de butanol hoje possui um grande entrave – o próprio butanol inibe a ação de microrganismos do gênero *Clostridia*, resultando em baixas produtividades e onerosos processos de separação.

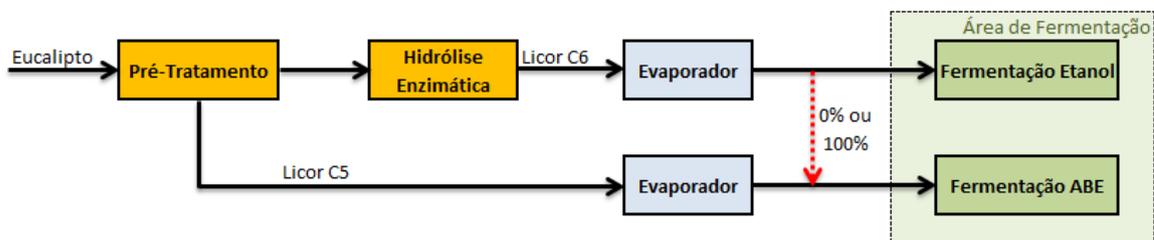


Figura 6: Diagrama de blocos do processo estudado neste trabalho

2.8 Processos de fermentação

Fermentação é o nome dado ao conjunto de reações metabólicas, portanto enzimaticamente controladas, cujo objetivo é a obtenção de energia (catabolismo). Estas reações ocorrem na ausência de gás oxigênio, seja por faculdade ou obrigatoriedade do organismo (bactéria ou fungo) que a desenvolve (Nelson & Cox 2011). Desde a antiguidade, estas reações são do interesse da humanidade devido à

miríade de produtos decorrente delas, como alimentos, medicamentos, combustíveis, solventes e matérias-primas para outros produtos (Ward 1991). O desejo de controlá-las pelo seu potencial econômico, a possibilidade de realizá-las em grande escala devido à revolução industrial e a súbita diminuição de um conservadorismo anti-científico com a revolução francesa, fizeram com que a pesquisa em geral (e também em processos fermentativos) começasse a ganhar relevância no mundo acadêmico e industrial no início do século XIX (Le Couteur & Burreson 2006; Hobsbawm 1962).

Atualmente, processos de fermentação mais comuns, como fermentação alcoólica (produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*) ou fermentação ABE (produção de acetona, butanol e etanol pela bactéria *Clostridium acetobutylicum*) são bem conhecidas e suas características bem difundidas. Por motivos econômicos, multiplicam-se os microrganismos em uma etapa anterior chamada de propagação ou preparo do inóculo. Quando a taxa de multiplicação dos microrganismos é máxima, transfere-se o inóculo ao fermentador, de modo a maximizar a produtividade do processo (Mosier et al. 2005).

Processos de fermentação batelada possuem uma curva padrão de crescimento celular de comportamento sigmoidal. A primeira fase é caracterizada por uma etapa de latência, onde não há crescimento celular, consumo de substrato ou formação de produto. Neste momento, o microrganismo está se adaptando ao meio de cultura, produzindo as enzimas necessárias para a metabolização do substrato.

Posteriormente, há uma fase de crescimento exponencial. As células, cuja população ainda é baixa, gozam de uma disponibilidade de substrato e praticamente não há produto formado. Sendo assim, as células aumentam sua população exponencialmente e esta taxa possui um valor máximo, cujo valor depende da composição do meio, temperatura de crescimento, pH, oxigenação e agitação principalmente (Rehm & Reed 1983). Então, as células cessam seu crescimento e a população se mantém, na fase denominada estacionária. Por fim, a população colapsa e começa a diminuir em uma fase de morte celular. Industrialmente, é

interessante que o processo de fermentação batelada seja interrompido ao final da formação de produto. No caso de fermentação alcoólica ou ABE, a fermentação possui formação de produto e crescimento celular associados. Sendo assim, é interessante interromper a fermentação ao final da fase exponencial.

A atividade metabólica microbiana pode ser limitada devido à presença de substâncias específicas. No caso de fermentação de substratos de origem lignocelulósica, os produtos de degradação da glicose, xilose e lignina podem afetar o desempenho de microrganismos.

No caso da *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, furfural, 5-HMF e ácido acético podem inibir sua ação, a depender de sua concentração. Concentrações de ácido acético superiores a 7,0 g/L interferem quimicamente no metabolismo da levedura, aumentando severamente sua fase de latência e diminuindo a taxa de crescimento na fase exponencial (Maiorella et al. 1983). Já a bactéria *Clostridium acetobutylicum* apresenta uma diminuição entre 5% e 10% na produção total de ABE quando as concentrações de furfural e 5-HMF excedem 3 g/L (Y. Zhang et al. 2012). Compostos fenólicos, oriundos da degradação da lignina, devem ser mantidos a valores inferiores a 1,7 g/L (Mussatto & Roberto 2006).

No entanto, o componente que de fato encarece a produção de butanol via fermentação comparada a sua produção de origem fóssil é o próprio butanol. Enquanto o etanol inicia a inibição a fermentação alcoólica a partir de concentrações de 60 g/L (Mosier et al. 2005; Maiorella et al. 1983), a produção de butanol é inibida pelo produto em concentrações próximas a 13 g/L (Mariano et al. 2011).

Talvez o único trabalho avaliando fermentação ABE em cavacos de eucalipto hidrolisado foi feito por Zheng e colaboradores. Partindo-se de pré-tratamento com explosão a vapor e hidrólises enzimáticas a cargas de biocatalisador elevadíssimas (175 FPU/g), os pesquisadores lograram hidrolisar eucalipto em teores elevados de sólidos, alcançando meios com mais de 95 g/L de glicose. A fermentação ABE,

conforme observado em outros estudos, não ultrapassa concentrações de 20 g/L de produtos (Zheng et al. 2015).

Limitado por concentrações baixas de produto, o processo de produção de butanol via rota bioquímica possui uma demanda de energia (vapor) elevada, tornando-o pouco atrativo frente a outras tecnologias concorrentes. Sendo assim, a remoção do produto de fermentação combinada com a reação bioquímica se faz necessária para tornar a produção de butanol economicamente viável por esta rota.

2.9 Intensificação de Processos

Frente à necessidade em se remover o butanol do caldo de fermentação devido à toxicidade, várias tecnologias vêm sendo estudadas, como fermentação flash, adsorção, cristalização, extração líquido-líquido, extração a vácuo, osmose reserva e diversas modalidades de pervaporação (Kujawska et al. 2015). Apesar da miríade de tecnologias estudadas, a literatura carece de uma comparação de parâmetros econômicos entre elas (Gottumukkala et al. 2017).

Fermentação a vácuo

A aplicação de vácuo durante a fermentação permite que os produtos sejam removidos por evaporação e condensados em um condensador, obtendo-os em fase líquida a uma concentração maior do que a presente no reator (elevada seletividade). Não são necessários tanques adicionais para promover a separação do produto e não há adição de um agente de separação. Por se tratar de uma operação a vácuo, a demanda energética chega a superar àquela de destilar o produto proveniente de uma fermentação batelada convencional. Como alternativa, a aplicação de vácuo intermitente reduz a demanda energética ao passo que ainda traz aumento de produtividade (Gottumukkala et al. 2017).

Mariano e colaboradores (Mariano, Qureshi, et al. 2012) estudaram a operação de uma fermentação a vácuo. A produção de ABE ocorreu em meio sintético com uso do microrganismo *Clostridium beijerinckii*. Como resultados, reverteu-se o problema

de inibição, obtendo um produto com títulos maiores de butanol ao passo que melhoraram o consumo de substrato e houve diminuição no tempo de fermentação. A mesma tecnologia foi testada com sucesso para a produção de etanol (Nguyen et al. 2011).

Huang e colaboradores fermentaram resíduo urbano para a produção de ABE e compararam uma fermentação batelada com a aplicação de vácuo intermitente para a extração do produto. A produtividade de ABE aumentou de 0,41 g/Lh para 0,49 g/Lh (Huang et al. 2015).

Fermentação Flash

A tecnologia de fermentação flash consiste em remover parte do caldo de fermentação e enviá-lo a um tanque flash, que vaporizará parte dos produtos e, em seguida o caldo retornará para a fermentação, não estressando o microrganismo, mantendo-a sempre a pressão ambiente. Ganhos energéticos significativos são observados, mas a seletividade da extração é baixa, além da necessidade de um tanque adicional necessário para a separação (Gottumukkala et al. 2017).

Mariano e colaboradores (Mariano, Filho, et al. 2012) sugeriram e avaliaram energeticamente o uso da fermentação flash na separação in situ de ABE. Nesta simulação, o fermentador opera de modo contínuo, bem como a extração do produto. Alcançou-se concentrações de butanol de 37 g/L.

Adsorção

Similarmente a fermentação flash, o caldo de fermentação é removido, passando por um separador de células. O caldo decelularizado passa por um leito fixo com algum adsorbente que retém o produto. Apesar da capacidade de regeneração dos adsorbentes, extrações eficientes ocorrem apenas quando a concentração de solventes é elevada.

Oudshoorn e colaboradores estudaram a capacidade de zeolitas em adsorver os produtos de fermentação ABE, visando o seu uso durante a própria operação. Além

de testarem diversos meios, inclusive caldo de fermentação, observaram que as zeólitas possuem preferência em adsorver o n-butanol em relação à acetona e etanol (Oudshoorn et al. 2009).

Dessorção

Dessorção (*gas stripping*) consiste na remoção de solventes do caldo de fermentação pela passagem de uma corrente de gás (geralmente inerte e não custoso, como gás nitrogênio), que posteriormente passa por um condensador, para recuperar os produtos. A adição de uma nova substância ao meio não pode interferir no metabolismo do microrganismo. Apesar de sua operação simples, a dessorção não se mostra tão seletiva quanto outras técnicas, e os requerimentos energéticos com condensação aumentam, uma vez que gases incondensáveis passam pelo equipamento de recuperação do produto.

Ezeji e colaboradores estudaram a dessorção in situ em fermentações ABE. O processo intensificado alcançou títulos de ABE de 23,6 g/L, enquanto as operações separadas obtiveram uma concentração de 17,7 g/L. Além disso, esta técnica não removeu ácidos do meio e nem afetou negativamente o desempenho dos microrganismos (Ezeji et al. 2003).

Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido consiste em adicionar uma terceira substância ao meio que extrairá os produtos do caldo de fermentação, formando uma mistura bifásica. Além dos custos envolvidos em comprar este solvente, deve-se atentar para que este não seja tóxico, além de propor uma unidade de purificação para que seja feito seu reciclo. Esta operação geralmente apresenta elevada seletividade.

Van den Berg e colaboradores (van den Berg et al. 2013) conseguiram manter as concentrações de butanol no meio reacional próximas 6 g/L através da conversão de parte do álcool a ácido butílico, seguida de uma esterificação a butanoato de butila e extração in situ com hexadecano. O produto pode, então, ser utilizado para o enriquecimento de diesel. No entanto, se o produto desejado for o butanol, seria

necessário reverter ambas as reações, sendo que uma delas (esterificação) é catalisada por enzimas.

As possibilidades de intensificação de processo são inúmeras, conforme apresentado. No entanto, para este estudo, busca-se uma tecnologia que minimize o número de fermentadores para a produção de etanol e ABE de modo integrado e que seja uma tecnologia aplicada a ambos os microrganismos.

Seguindo a filosofia de se manter o processo simples, sem a introdução de novos tanques ou substâncias químicas (que respectivamente refletem em custos de capital e operação), acredita-se que a tecnologia a vácuo intermitente seja a mais indicada para o processo de produção de butanol e etanol integrados, uma vez que este mostrou aumentos de produtividade e diminuição da demanda energética do processo de modo global.

2.10 Considerações finais

Os principais pontos desta revisão bibliográfica são:

- Frente a um possível (e provável) declínio da indústria de papel e celulose, os principais players do setor têm indicado que a diversificação de seu portfólio de produtos deve ocorrer em breve. Dentre os possíveis produtos, destacam-se aqueles produzidos por tecnologias de segunda geração.
- Pouca literatura foi encontrada sobre pré-tratamento de eucalipto utilizando-se ácido sulfúrico diluído, que já se mostrou eficiente com outras biomassas, inclusive por pesquisa desenvolvida em nosso grupo de estudo. Outras tecnologias foram testadas (como explosão a vapor) com eucalipto e apresentaram bons resultados.
- A produção de butanol requer um processo intensificado com extração de produto simultânea para tornar o n-butanol de origem renovável competitivo com o seu equivalente de origem fóssil. Existem várias tecnologias disponíveis para tal,

mas a fermentação com vácuo intermitente mostra-se promissora, devido à elevada seletividade, não necessidade de reatores adicionais e menor consumo energético se comparado à aplicação de vácuo continuamente.

A luz da revisão bibliográfica verificou-se que pouca literatura foi produzida com relação à fermentação ABE a partir de hidrolisados lignocelulósicos, em especial a partir de cavacos de eucalipto. Além de enriquecer a pesquisa no tangente destes assuntos, este trabalho tem por objetivos resolver dois principais problemas não abordados hoje pela literatura e que podem viabilizar a produção de ABE novamente por rotas bioquímicas. São eles:

1. Avaliar uma tecnologia para a produção de etanol e ABE que possa ser alocada a uma indústria de papel e celulose. Aqui, não se visa apenas diversificar o portfólio de uma biorrefinaria, mas também estudar e propor um processo flexível entre a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* e *Clostridium acetobutylicum*.

2. Propor modalidades de fermentação a vácuo que permitam superar o problema imposto pela inibição do produto ao metabolismo dos próprios microrganismos.

Capítulo 03 - Preparo e caracterização da biomassa, enzimas e microrganismos

3.1 Introdução

Conhecer a composição química e arranjo molecular da biomassa é crucial para compreender quais são os rendimentos teóricos máximos do seu processamento para a obtenção de produtos de segunda geração, bem como as limitações que impedem que estes valores sejam alcançados.

Os protocolos de determinação da composição química de biomassas em geral são bem definidos por instituições de pesquisa como o *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) e a TAPPI (*Technical Association of the Pulp and Paper Industry*), e são utilizados neste trabalho.

Além de conhecer a composição da biomassa, deve-se conhecer o potencial das enzimas utilizadas para catalisar a reação de hidrólise das fibras de celulose e hemicelulose. O potencial das enzimas é chamado de atividade enzimática e também segue protocolos bem definidos segundo a enzima estudada. Neste trabalho, foram avaliadas a atividade enzimática das celulasas, β glicosidades e xilanasas. As condições de operação ótimas das enzimas foram adotadas segundo o fornecedor (Novozymes). Por fim, deve-se conhecer a linhagem das cepas utilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Clostridium beijerinckii*.

3.2 Caracterização da Biomassa

3.2.1 Biomassa.

Os cavacos de eucalipto utilizado durante toda a pesquisa foram gentilmente cedidos pelo parceiro industrial Fibria Celulose S/A, proveniente da unidade localizada na cidade de Jacareí (SP) e pertence à espécie *Eucalyptus urograndis*. Cavacos de eucalipto foram coletados do pátio industrial no mês de dezembro de 2015. A biomassa, ao chegar, foi secada a céu aberto em sombra até que sua umidade alcançasse o valor de 10%, para que não houvesse degradação da biomassa por ação de microrganismos e fungos. A biomassa foi estocada em sacos plásticos e sua umidade foi monitorada trimestralmente.

3.2.2 Preparo da Matéria-Prima

Após a secagem dos cavacos, estes foram moídos em um moinho de martelos (Moinho tigre S.A, CV2, Brasil), com acionamento elétrico por um motor de indução de 3800 rpm CV5 (General Electric, 25.4062.405, Brasil), apresentado na Figura 7. O eucalipto moído é apresentado na Figura 8.



Figura 7: Moinho de martelos e motor de indução de 3800 rpm utilizado para processar o eucalipto

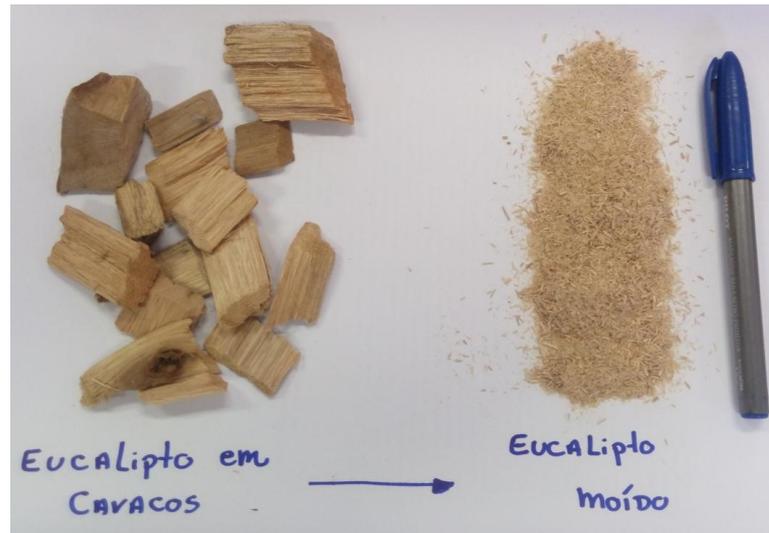


Figura 8: Eucalipto em cavacos e eucalipto moído pelo moinho.

3.2.3 Procedimento experimental – caracterização física e química da biomassa

Análise granulométrica

Após a moagem, determinou-se a distribuição granulométrica e o tamanho médio da partícula de eucalipto moída, utilizando-se peneiras da série de Tyler. O procedimento da análise é descrito no Anexo I deste documento.

Composição química

O procedimento descrito a seguir tem por objetivo determinar a composição da biomassa com relação aos seis componentes principais: celulose, hemicelulose, grupos acetila, lignina, cinzas e extrativos. Todas as etapas adotadas seguem as normativas do NREL (a Sluiter et al. 2008; Sluiter et al. 2011; Hames et al. 2008; A. Sluiter et al. 2008; Sluiter et al. 2012), com exceção da medição de lignina solúvel que segue uma metodologia que considera a concentração de inibidores (Gouveia et al. 2009).

As principais etapas da determinação da composição química são apresentadas no fluxograma da Figura 9. Os procedimentos de cada uma das etapas são descrito

no Anexo II (medição de umidade), Anexo III (determinação de extrativos), Anexo IV (determinação de cinzas), Anexo V (hidrólise ácida dos sólidos), Anexo VI (determinação da lignina insolúvel), Anexo VII (determinação da lignina solúvel) e Anexo VIII (determinação de carboidratos estruturais).

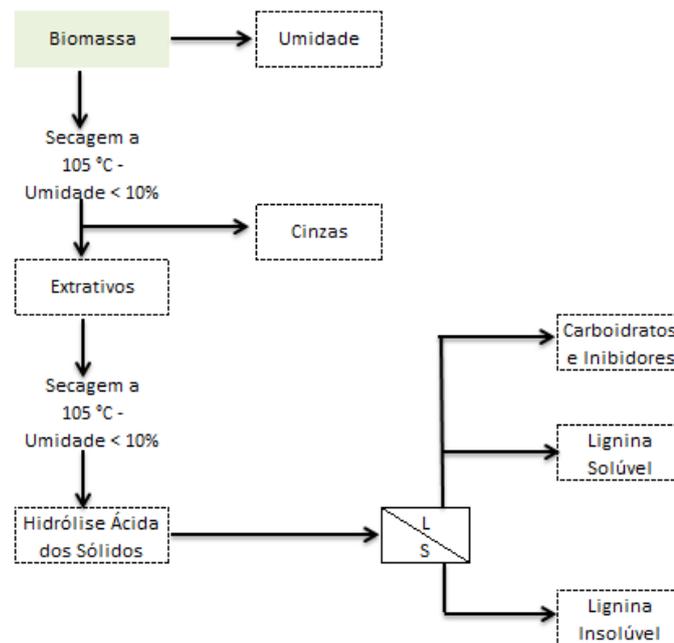


Figura 9: Fluxograma com todas as etapas utilizadas para determinar a composição química do eucalipto.

Difração de Raios-X

Como último parâmetro para a caracterização da biomassa, determinou-se seu índice de cristalinidade via difração de raios X (DRX). Foi utilizado difratômetro de raios-X, marca: Philips analytical X-Ray; modelo: X'Pert-MPD; radiação: $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$); $10^\circ < 2\theta < 50^\circ$, com passo de $0,05^\circ$ a cada 3 s. O índice de cristalinidade mostra a relação a porcentagem de sítios cristalinos em relação aos sítios totais – cristalinos e amorfos – da celulose, que impacta diretamente na capacidade do material em ser hidrolisável. As análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC), na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

O índice de cristalinidade I_{Cr} é calculado por:

$$I_{Cr} = 1 - \frac{I_{\min}}{I_{\max}}$$

Sendo I_{\min} a intensidade mínima do pico cristalino ($18 \leq 2\theta \leq 19$) e I_{\max} é a intensidade de seu máximo ($22 \leq 2\theta \leq 23$) (Kalia & Kaith 2009).

3.2.4 Resultados da caracterização física e química do eucalipto.

Análise Granulométrica

A distribuição granulométrica do eucalipto moído é apresentada na Figura 10 e seu tamanho médio é de 0,555 mm. Pela análise da distribuição, algumas informações podem ser concluídas. Primeiramente, a diminuição do tamanho da partícula de Eucalipto é significativa: o cavaco de eucalipto possui em média 30 mm de comprimento e 10 mm de largura, o que indica uma redução de duas ordens de grandeza das dimensões do material.

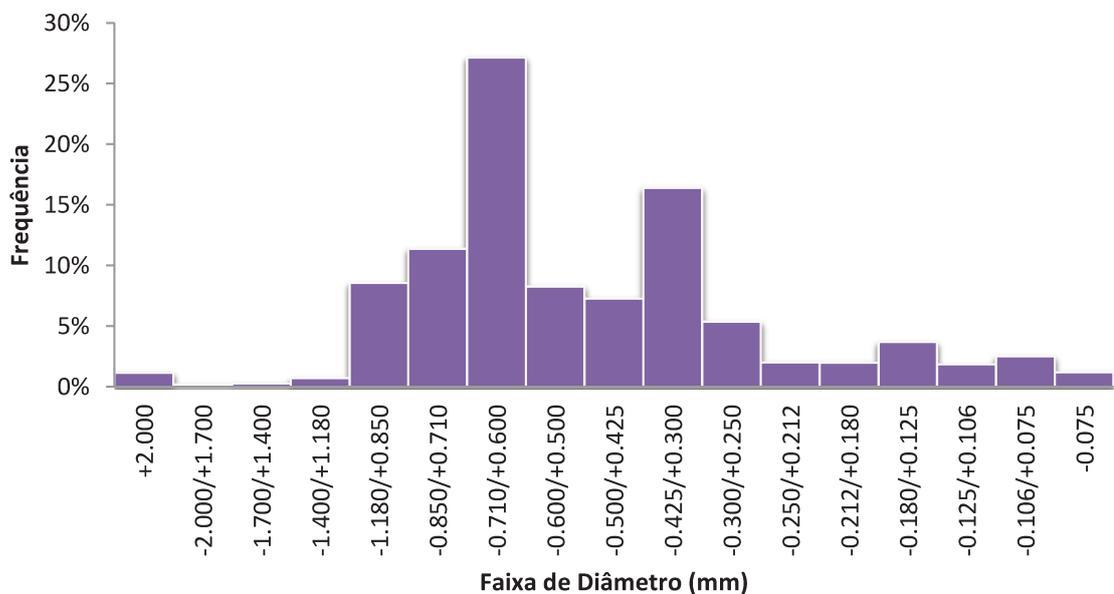


Figura 10: Distribuição granulométrica do eucalipto moído

Além disso, pela distribuição granulométrica, observa-se que a peneira do moinho utilizado apresenta uma variabilidade elevada na dimensão da partícula moída, tendo em vista os dois picos formados. No entanto, a faixa de diâmetros de partícula é diminuta e esta será utilizada em sua totalidade nos experimentos, a fim de não se perder fração de matéria-prima.

Composição Química

A composição química do eucalipto foi determinada pelos procedimentos experimentais descritos e é apresentada na Figura 11. A soma de todos os componentes totalizam $98 \pm 4 \%$, com um intervalo de confiança de 95% para a caracterização realizada em triplicata. Os resultados obtidos são similares aos das espécies sul-americanas encontradas na literatura, apresentadas na revisão bibliográfica desta dissertação. São marcadas por elevados teores de celulose e lignina e baixos teores de cinzas. O teor de xilanas é menor se comparado a outras biomassas.

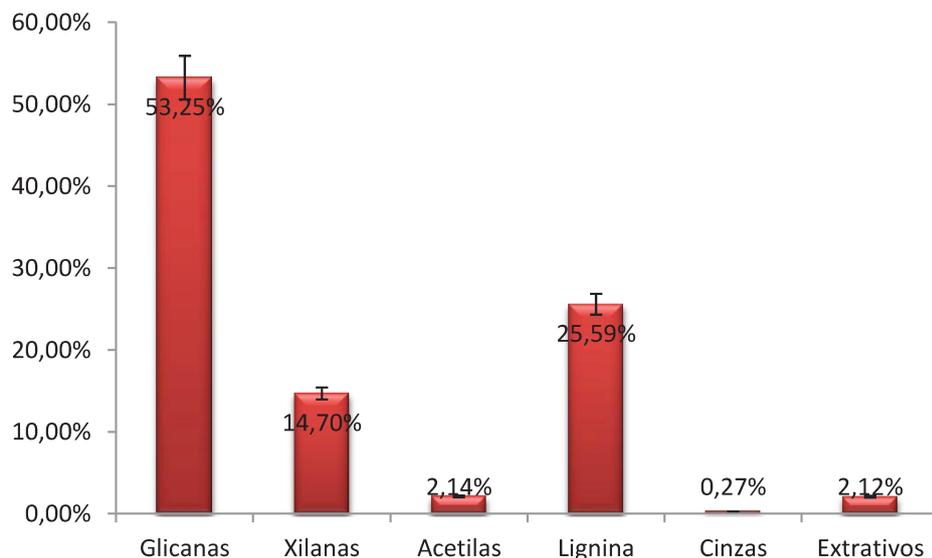


Figura 11: Composição química em base seca do eucalipto utilizado como matéria-prima

Índice de Cristalinidade

O difratograma obtido do eucalipto in natura é apresentado na Figura 12, e a partir dos valores de intensidade mínimo (577) e máximo (1373), calcula-se o índice

de cristalinidade do eucalipto: $I_{Cr} = 1 - \frac{I_{\min}}{I_{\max}} = 1 - \frac{577}{1373} = 58\%$.

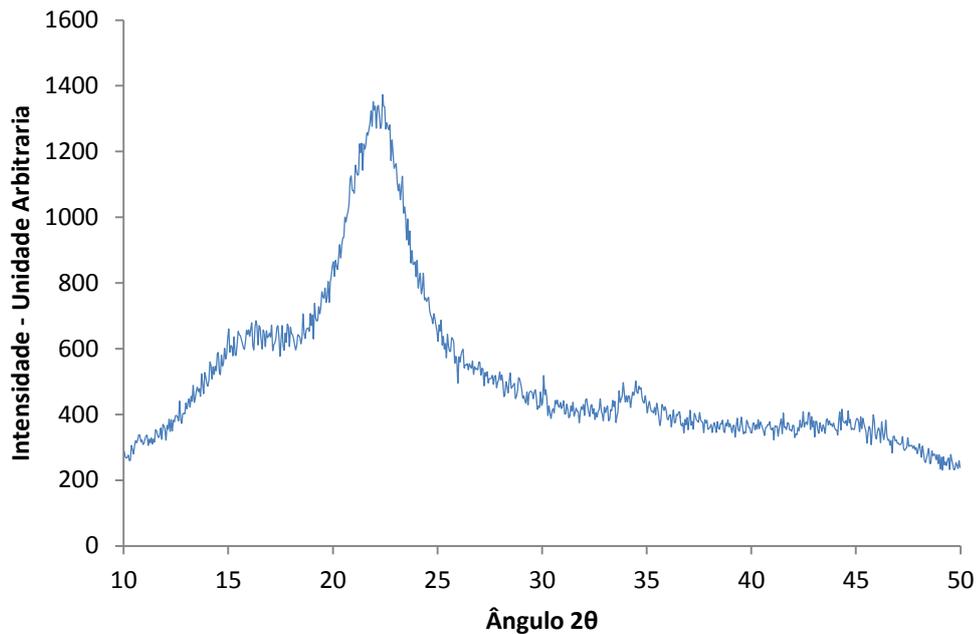


Figura 12: Difratograma da análise de eucalipto in natura.

O valor encontrado de índice de cristalinidade condiz com os valores reportados na literatura, apresentados na revisão bibliográfica. É um valor relativamente elevado comparado a outras biomassas e serve como indicativo da elevada recalcitrância do eucalipto. Este é um indicativo de que um pré tratamento agressivo se faz necessário. Uma rota de processo que seja capaz de diminuir este número é necessária para que a hidrólise enzimática ocorra com conversões economicamente satisfatórias.

3.3 Caracterização dos coquetéis enzimáticos

3.3.1 Coquetéis Enzimáticos

Os coquetéis enzimáticos utilizados foram gentilmente cedidos pelo parceiro industrial Novozymes, localizada na cidade de Araucária (PR). Os coquetéis utilizados foram Cellic CTec 2, NS 22244 e β -glicosidase comercial (Sigma Aldrich). As atividades enzimáticas foram determinadas trimestralmente segundo protocolos pré-estabelecidos descritos nos próximos tópicos.

3.3.2 Procedimento Experimental

Caracterização das Celulases

Para determinar-se a atividade enzimática das celulases presentes no coquetel Cellic CTec 2, avaliou-se a capacidade do coquetel em converter papel de filtro Whatman nº 1 (celulose) em açúcares redutíveis totais (ART) (Ghose 1987). Os açúcares foram quantificados segundo método colorimétrico, utilizando-se o reagente DNS (ácido dinitro-3,5-salicílico) (Miller 1959). O método consiste na redução do reagente a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico ao passo que o grupo aldeído do carboidrato é oxidado a uma carboxila, que confere uma coloração alaranjada ao meio reacional, permitindo sua quantificação via espectrofotometria. A 540 nm. Tanto o método de determinação da atividade enzimática como de preparo do reagente DNS são descritos no Anexo IX.

Os dados experimentais forneceram uma relação linear entre o título de enzimas (τ_e), em g de enzimas/g de solução e a concentração de ART (C_{ART}) em mg ART / 0,5 mL solução. A atividade enzimática da celulase é definida como a taxa da reação para se produzir 2 mg de glicose utilizando-se 0,5 mL de coquetel enzimático em 60 min de reação e sua unidade é dada em FPU/mL (*filter paper unit* ou unidades de papel de filtro) ou $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ (Ghose 1987). Sendo assim

$$A_c (\text{FPU} / \text{mL}) = \frac{m_g}{V_c \cdot MM_g \cdot t \cdot \tau_e}$$

Onde,

- A_C é a atividade enzimática da celulase, em FPU/mL
- m_g é a massa de glicose liberada (2 mg)
- V_e é o volume do coquetel enzimático utilizado (0,5 mL)
- MM_g é a massa molar da glicose em (0,18016 mg/ μ mol)
- t é o tempo da reação (60 min)
- τ_e é o título de enzimas necessário para que ocorra a liberação de 2 mg de glicose, cuja função de relação é determinada experimentalmente,

Caracterização das β -Glicosidases

A atividade enzimática das β -Glicosidases adquiridas comercialmente foi quantificada avaliando-se a conversão de celobiose em glicose (Wood & Bhat 1988). O carboidrato foi quantificado segundo método enzimático glicose GOD-PAP (Henry et al. 1974). O método fundamenta-se na oxidação enzimática da glicose catalisada pela enzima glicose oxidase (GOD), formando peróxido de hidrogênio que, por sua vez, torna o meio rosado pela ação da peroxidase (PAP). O método de determinação da atividade enzimática é descrito no Anexo X.

Os dados experimentais forneceram uma relação linear entre o título de enzimas (τ_e), em g de enzimas/g de solução e a concentração de glicose (C_g) em mg glicose / mL solução. A unidade da atividade enzimática da celobiase é definida como a taxa da reação para se produzir 0,5 mg de glicose (ou seja, 0,5/0,18016 μ mol de celobiose) utilizando-se 1,0 mL de coquetel enzimático em 30 min de reação e sua unidade é dada em CBU/mL (*cellobiose unit* ou unidades de celobiose) ou μ mol/mL.min (Wood & Bhat 1988). Sendo assim

$$A_{\beta} (CBU / mL) = \frac{m_c}{V_c \cdot MM_g \cdot t \cdot \tau_e}$$

Onde,

- A_{β} é a atividade enzimática da β -glicosidase, em CBU/mL

- m_c é a massa de celobiose convertida (0,5 mg)
- V_e é o volume do coquetel enzimático utilizado (1,0 mL)
- MM_g é a massa molar da glicose em (0,18016 mg/ μ mol)
- t é o tempo da reação (30 min)
- τ_e é o título de enzimas necessário para que ocorra a liberação de 1 mg de glicose, cuja função de relação é determinada experimentalmente,

Caracterização das Xilanases

A atividade enzimática das xilanases presentes no coquetel NS 22244 foi quantificada avaliando-se a conversão de xilana a xilose. A análise foi executada cortesmente pelo Centro Brasileiro de Tencologia do Etanol (CTBE).

3.3.3 Resultados da atividade enzimática

Atividade das Celulases

A partir dos dados obtidos na execução do procedimento experimental descrito no Anexo IX, foram obtidos os dados de concentração de ART e seus respectivos títulos de enzima utilizados. Representa-se graficamente na Figura 13 o logaritmo na base 10 dos títulos das enzimas em função das concentrações de glicose obtidas.

Desta forma, a relação entre o título de enzimas (τ_e), em g de enzimas/g de solução e a concentração de ART (C_{ART}) em mg ART / 0,5 mL solução é:

$$\log_{10}(\tau_e) = 0,0799 * C_{ART} - 3,1607$$

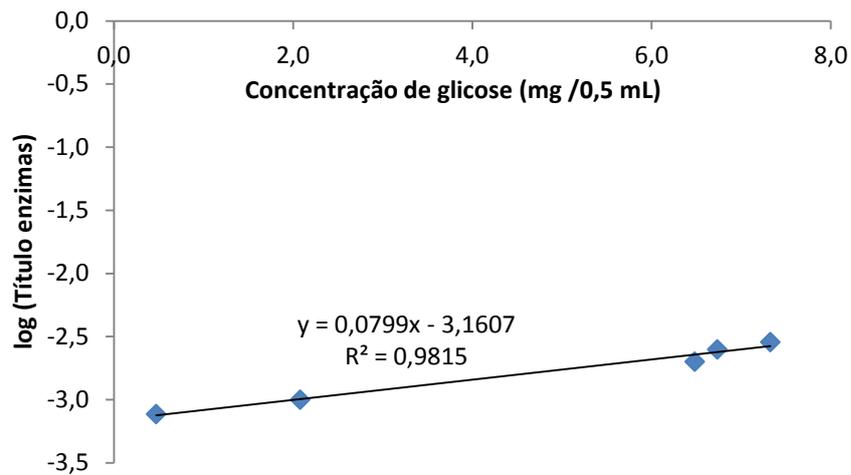


Figura 13: Dados experimentais obtidos na determinação da atividade enzimática da celulase

Para que haja liberação de 2 mg de glicose / 0,5 mL, é necessário um título enzimático de:

$$\log_{10}(\tau_e) = 0,0799 * 2 - 3,1607 = -3,0009$$

$$\tau_e = 0,000998 \frac{g \text{ - enzimas}}{g \text{ - solução}}$$

$$A_c (FPU / mL) = \frac{m_g}{V_c \cdot MM_g \cdot t \cdot \tau_e} = \frac{2}{0,5 * 0,180016 * 60 * 0,000998} = 370,7 FPU / mL$$

A atividade enzimática determinada (370,7 FPU/mL de coquetel) é consideravelmente elevada, mas seu valor é justificado por se tratar de um coquetel enzimático desenvolvido com componentes e cofatores que potencializam a ação das enzimas. Este valor foi utilizado para determinar o volume de enzimas requerido em cada ensaio de hidrólise.

Atividade das β -Glicosidases

A partir dos dados obtidos na execução do procedimento experimental descrito no Anexo X, foram obtidos os dados de concentração de glicose liberada e seus

respectivos títulos de enzima utilizados. Representam-se graficamente na Figura 14 os títulos das enzimas em função das concentrações de glicose obtidas.

Desta forma, a relação entre o título de enzimas (τ_e), em g de enzimas/g de solução e a concentração de glicose (C_{ART}) em mg glicose / mL solução é:

$$\tau_e = 0,00014 * C_g + 0,00010$$

Para que haja liberação de 1 mg de glicose / mL, é necessário um título enzimático

$$\tau_e = 0,00014 * 1 + 0,00010 = 0,0002375 \frac{g \text{ _ enzimas}}{g \text{ _ solução}}$$

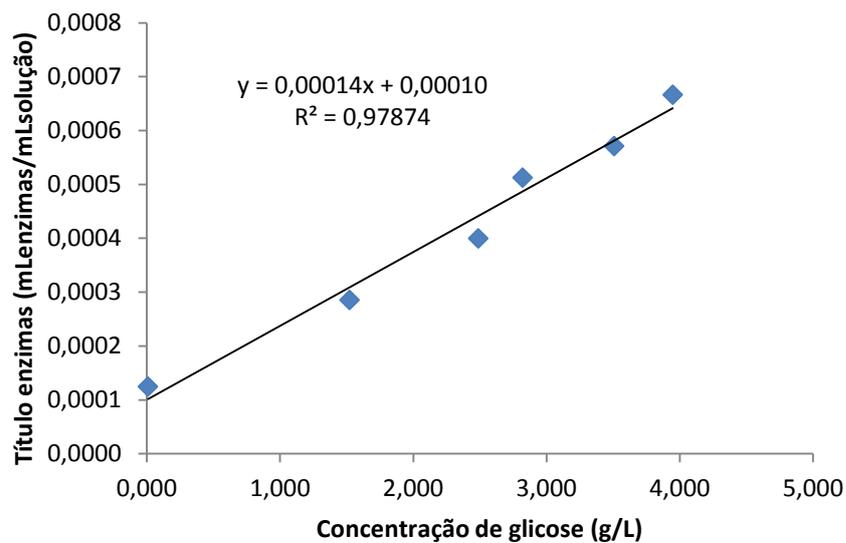


Figura 14: Dados experimentais obtidos na determinação da atividade enzimática da β -glicosidase.

A atividade enzimática da β -Glicosidases é calculada e o valor obtido (389 CBU/mL) é utilizado para determinar o volume de enzimas utilizado nos ensaios de hidrólise.

$$A_{\beta}(\text{CBU} / \text{mL}) = \frac{m_c}{V_c \cdot MM_g \cdot t \cdot \tau_e} = \frac{0,5}{1 * 0,18016 * 30 * 0,0002375} = 389 \text{ CBU} / \text{mL}$$

Atividade das Xilanases

A determinação da atividade enzimática das xilanases foi executada cortesmente pelo Centro Brasileiro de Tencologia do Etanol (CTBE). O procedimento utilizado encontra-se descrito no Anexo XI (Bailey et al. 1992; Squina et al. 2009) e seu valor é de 19122 IU/mL.

3.4 Cultura de microrganismos

3.4.1 Microrganismos

Para as fermentações para a produção de etanol, utilizou-se a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* isolada e gentilmente fornecida pela Usina Santa Adélia. Os estudos com a bactéria *Clostridium beijerinckii* utilizaram a cepa NCIMB 8052. A cepa foi gentilmente cedida pelo Bioenergy Laboratory da Ohio Agricultural R&D Center pertencente a Ohio State University

3.4.2 Manutenção e ativação dos microrganismos

Saccharomyces cerevisiae

A linhagem da levedura foi mantida regularmente em tubos inclinados contendo meio YPD (yeast extract, peptone & dextrose ou extrato de levedura, peptona e dextrose), cuja composição é descrita na Tabela 4. As cepas foram mantidas a 4 °C e era feito repique a cada trinta dias, a fim de se manter a atividade celular elevada. A ativação do microrganismo foi feita em 100 mL de meio YPD líquido, sob agitação a 250 rpm e climatizado a 33 °C por 24h. Após ativação, a microrganismo foi conservado em tubos inclinados contendo meio YPD sólido.

Tabela 4: Composição do meio YPD - sólido e líquido

	Concentração (g/L)	
	Sólido	Líquido
d-Glicose	20	20
Extrato de Levedura	10	10
Peptona	20	20
Ágar-Ágar	20	---

Clostridium beijerinckii

A fermentação bacteriana foi feita com a cepa *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052, cuja solução estoque de esporos era armazenada em câmara fria, a 4 °C. Os esporos são mantidos em água estéril e sua ativação consiste em submeter uma amostra a 75 °C por 10 min em um banho seco, seguido de um banho de gelo por 2 min.

Capítulo 04 - Ensaio de pré-tratamento e hidrólise enzimática

4.1 Introdução

Este capítulo é dedicado a avaliar e compreender a transformação da estrutura vegetal – agora já qualificada e quantificada – em açúcares fermentescíveis. Neste momento, busca-se avaliar o comportamento da biomassa frente à pré-tratamentos que utilizem agentes existentes em uma planta Kraft, como ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, procurando-se explorar os pontos de integração entre uma unidade existente de produção de papel e celulose e uma possível unidade de produção de etanol, butanol e acetona integrada.

Pretende-se, ao longo deste capítulo, cumprir um dos objetivos deste trabalho, que é “determinar as condições de preparo do substrato a ser utilizado em fermentação”, que foi utilizado nos ensaios do capítulo 05 deste trabalho.

4.2 Procedimento Experimental

Foram avaliados dois agentes de pré-tratamento distintos e possíveis combinações entre eles: ácido sulfúrico e hidróxido de sódio. O pré-tratamento com ácido sulfúrico será, a partir de agora, denominado apenas “pré-tratamento”, enquanto o pré-tratamento com hidróxido de sódio será chamado de “deslignificação”. Após o pré-tratamento, coleta-se uma alíquota do líquido para análise e a fração sólida é destinada a etapa de hidrólise enzimática.

Devido ao caráter exploratório desta etapa do projeto, testaram-se diversas condições de operação para as três etapas citadas, como teor de sólidos, teor de ácido, teor de base, tempo de batelada, temperatura e carga enzimática. Todas as variáveis serão descritas enquanto se apresenta o procedimento experimental e memorial de cálculo para o primeiro ensaio realizado. Para os demais casos, serão apresentadas apenas a escolha das variáveis e os resultados obtidos.

4.2.1 Memorial de cálculo

Pré-Tratamento

Ao início do pré-tratamento, define-se a massa reacional total (120 g) e o teor de sólidos a ser utilizado na prova (15%). O teor de sólidos é definido como a razão entre a massa de sólidos secos e a massa reacional total:

$$DM = \frac{m_{sbs}}{m_t} = \frac{m_{sbs}}{m_{sbu} + m_{sa}}$$

Onde:

- DM: teor de sólidos ou *dry matter* (g sólidos secos / g totais);
- m_{sbs} : massa de solução em base seca (g);
- m_{sbu} : massa de solução em base úmida (g);
- m_{as} : massa de solução ácida (g)

A massa de sólidos secos, neste caso, é $120 \times 0,15 = 18,0g$. Toma-se, então uma amostra de sólidos (seja eucalipto in natura, seja eucalipto deslignificado) e mede-se sua umidade conforme descrito no Anexo II. Para este exemplo, a umidade é de 6,1%. Para determinar a quantidade de sólidos, parte-se da definição de umidade:

$$U = \frac{m_{agua}}{m_{sbu}} = \frac{m_{sbu} - m_{sbs}}{m_{sbu}} \Rightarrow 0,061 = \frac{m_{sbu} - 18,0}{m_{sbu}} \Rightarrow m_{sbu} = 19,17g$$

Onde:

- U: umidade (g água / g material)
- m_{agua} : massa de água (g)

A solução ácida possui um teor de ácido sulfúrico definido em base mássica (título), ou seja, razão entre massa de ácido e massa de solução. Para este ensaio, utilizou-se teor de 1%. Para determinar a quantidade de solução ácida, basta subtrair da massa total, a massa de sólidos úmidos e dividir o resultado pela massa específica da solução que, para soluções cujo título for menor que 5%, adotou-se 1 g/L. Ou seja:

$$V_{sa} = \frac{m_t - m_{sbu}}{\rho_{sa}} = \frac{(120 - 19,17)}{1} = 99,65 \text{ mL}$$

Onde:

- V_{sa} : volume de solução ácida (mL)
- ρ_{sa} : massa específica da solução ácida (g/L)

Deslignificação

Para a etapa de deslignificação, o memorial de cálculo é exatamente o mesmo do pré-tratamento, com a exceção de que se tem uma solução básica, com um teor definido de hidróxido de sódio ao invés de uma solução ácida. Para uma massa reacional total de 50 g, toma-se o sólido (seja ele pré-tratado ou in natura) e um teor de sólidos desejado de 15,0%, afere-se sua umidade segundo procedimento no Anexo II (neste exemplo, 12,4%). Analogamente aos cálculos do pré-tratamento, determina-se a massa de sólidos secos:

$$m_{sbs} = 50 \times 0,15 = 7,5g$$

Com o valor da umidade, determina-se a massa de sólidos úmidos:

$$0,124 = \frac{m_{sbu} - 7,5}{m_{sbu}} \Rightarrow m_{sbu} = 8,56g$$

E, por fim, o volume de solução básica, cujo teor de hidróxido de sódio foi definido como 2% neste ensaio:

$$V_{sb} = \frac{m_t - m_{sbu}}{\rho_{sb}} = \frac{(50 - 8,56)}{1} = 41,44 \text{ mL}$$

Onde:

- V_{sb} : volume de solução básica (mL)
- ρ_{sb} : massa específica da solução básica (g/L)

Hidrólise Enzimática

Para a reação de hidrólise enzimática, inicia-se definindo a massa total de reação (50g, neste caso) e o teor de sólidos desejados (10%). Calcula-se a massa de

sólidos secos a serem utilizados na prova ($m_{sbs} = 50 \times 0,1 = 5g$) e, com a umidade do sólido in natura ou pré-tratado (neste caso, 8,7%), calcula-se o teor de sólidos úmidos.

$$0,087 = \frac{m_{sbu} - 5,0}{m_{sbu}} \Rightarrow m_{sbu} = 5,48g$$

Para os ensaios desta etapa, utilizou-se como meio líquido uma solução tampão de íon citrato 50 mmol/L, para evitar-se a correção de pH manualmente. O volume da solução é calculado pela diferença entre a massa total reacional e a massa de sólidos úmidos, divididos pela massa específica da solução, que foi adotada como 1 g/L:

$$V_{st} = \frac{m_t - m_{sbu}}{\rho_{st}} = \frac{(50 - 5,48)}{1} = 44,52 \text{ mL}$$

Onde:

- V_{st} : volume de solução tampão (mL)
- ρ_{st} : massa específica da solução tampão (g/L)

O volume de enzimas a ser adicionado é função da carga enzimática escolhida que, na maioria dos casos foi 15 FPU/g sólidos seco (Martin et al. 2012). Do capítulo 3, a atividade do coquetel de celulases é 380 FPU/mL de coquetel. Logo:

$$V_e = \frac{C_e \times m_{sbs}}{AE} = \frac{15 \times 5}{380} = 0,197 \text{ mL ou } 197 \mu\text{L}$$

Onde:

- V_e : volume de coquetel enzimático (mL)
- C_e : Carga enzimática (FPU / g sólidos secos)
- AE: Atividade enzimática (FPU / mL de coquetel)

4.2.2 Materiais e Métodos

Pré-Tratamento

Para os ensaios de pré-tratamento realizados a 121 °C ou menos, aferiu-se a massa de um frasco Schott-Duran e nele, colocou-se a massa de sólidos e o volume de solução ácida desejada. Afere-se a massa do conjunto frasco/biomassa/solução e registra-se. Pré-aquece-se o autoclave com temporizador e controle de temperatura automático (Marca Phoeniz-Luverco, modelo AV-50 plus) a 90°C e coloca-se o frasco em seu interior. Após deixá-lo durante o tempo de batelada desejado, esperou-se que a pressão reduzisse a ambiente e resfriou-se os frascos em água corrente. Aferiu-se a massa do frasco quando este estivesse à temperatura ambiente.

Os pré-tratamentos realizados a temperatura superiores a 121 °C foram feitos em reatores *ad hoc* em aço inox, com capacidade de 500 mL, aquecidos em banho termostático (Marconi, modelo MA159/BB), utilizando glicerina como fluido térmico (Figura 15). O procedimento é o mesmo, com exceção de que se utilizou o reator ao invés do frasco Schott-Duran.



Figura 15: Reator em aço inox e banho termostático utilizados para reações a temperaturas superiores a 121°C (Agradecimento a LEPFE).

Ao final do pré-tratamento, separa-se as frações sólidas e líquidas com uma filtração simples utilizando-se uma peneira da série Tyler de mesh 500. Coleta-se uma alíquota de cada fração para análise quando necessário. A fração líquida, rica em pentoses, é conservada para os casos de fermentação utilizando-se xilose como

substrato. O sólido era lavado até que a água de lavagem alcançasse pH neutro e secado por convecção natural até que sua umidade atingisse um valor inferior a 10% e, então congelado para futuro uso. Após sua secagem, aferia-se sua umidade e massa.

Deslignificação

Todos os ensaios de deslignificação foram realizados a 121 °C ou menos. Aferiu-se a massa de um frasco Schott-Duran e nele, colocou-se a massa de sólidos e o volume de solução básica desejada. Aferiu-se a massa do conjunto frasco/biomassa/solução e registrou-se. Pré-aqueceu-se o autoclave com temporizador e controle de temperatura automático (Marca Phoeniz-Luverco, modelo AV-50 plus) a 90°C e colocou-se o frasco em seu interior. Após deixá-lo durante o tempo de batelada desejado, esperou-se que a pressão reduzisse a ambiente e resfriou-se o frasco em água corrente. Aferiu-se a massa do frasco quando este estivesse à temperatura ambiente.

Ao final da deslignificação, separaram-se as frações sólidas e líquidas com uma filtração simples utilizando-se uma peneira da série Tyler de mesh 500. Coletou-se uma alíquota de cada fração para análise quando necessário. A fração líquida teve seu pH corrigido e era então descartada. O sólido era lavado até que a água de lavagem alcançasse pH neutro e secado por convecção natural até que sua umidade atingisse um valor inferior a 10% e, então congelado para futuro uso. Após sua secagem, aferia-se sua umidade e massa.

Hidrólise Enzimática

Os ensaios preliminares de hidrólise enzimática foram executados em frascos erlenmeyers. Doze horas antes da prova, coloca-se a biomassa e a solução tampão no frasco, cobrindo-o com papel alumínio para que haja a embebição da biomassa pelo meio líquido. Após as 12h, coloca-se o frasco por 30 min na incubadora (Marconi, modelo MA380) a 50 °C e sob agitação de 250 rpm para ambientação do

meio. Posteriormente, adiciona-se o coquetel enzimático e deixa-se o frasco pelo tempo desejado de batelada.

Ao final da reação de hidrólise, separaram-se as frações sólidas e líquidas com uma filtração simples utilizando-se uma peneira da série Tyler de mesh 500. Coletou-se uma alíquota de cada fração para análise quando necessário. Nesta etapa, ambas as frações sólida e líquida foram descartadas.

4.2.3 Análise das amostras

Para qualquer uma das etapas citadas, o procedimento analítico é o mesmo para a caracterização da polpa. Em algumas análises, realizou-se o procedimento completo, para que houvesse uma melhor compreensão da operação à qual a biomassa foi sujeita. Para a grande maioria, no entanto, utilizou-se a versão simplificada do procedimento analítico, quantificando-se apenas os carboidratos disponibilizados após hidrólise.

O procedimento descrito a seguir tem por objetivo determinar a composição da polpa com relação aos cinco componentes principais: celulose, hemicelulose, grupos acetila, lignina e cinzas. Todas as etapas adotadas seguem as normativas do NREL (a Sluiter et al. 2008; Sluiter et al. 2011; A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter & Templeton 2008; Hames et al. 2008; A. Sluiter et al. 2008; Sluiter et al. 2012), com exceção da medição de lignina solúvel que segue uma metodologia que considera a concentração de inibidores (Gouveia et al. 2009).

As principais etapas da determinação da composição química são apresentadas no fluxograma da Figura 16. Os procedimentos de cada uma das etapas são descrito no Anexo II (medição de umidade), Anexo IV (determinação de cinzas), Anexo V (hidrólise ácida dos sólidos), Anexo VI (determinação da lignina insolúvel), Anexo VII (determinação da lignina solúvel), Anexo VIII (determinação de carboidratos estruturais), Anexo XII (Rendimento mássico), Anexo XIII (Determinação de carboidratos solúveis) e Anexo XIV (Hidrólise ácida do líquido).

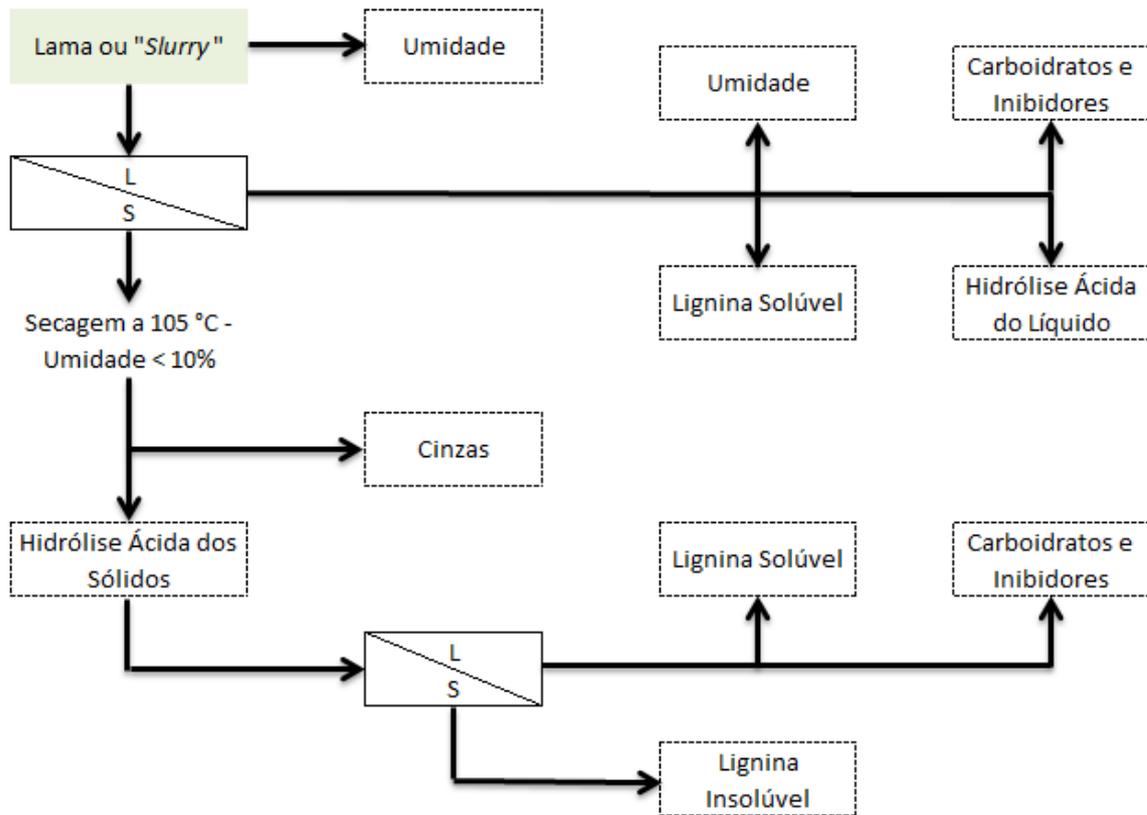


Figura 16: Fluxograma com todas as etapas utilizadas para determinar a composição química de polpas obtidas ao longo do processo.

4.3 Planejamento Experimental

Considerando o procedimento experimental descrito, realizou-se um pequeno planejamento experimental 2^2 , cujos fatores foram carga de sólidos e teor de ácido sulfúrico no pré-tratamento. Os níveis utilizados são apresentados na Tabela 5. Foram mantidos fixo, o tempo (60 min) e a temperatura (121 °C) de pré-tratamento, não se realizou deslignificação e a hidrólise enzimática foi realizada com teor de sólidos de 10 %, carga enzimática de 15 FPU/mL, 50 °C e 250 RPM.

Tabela 5: Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
% H ₂ SO ₄	0,5%	1,0%	1,5%
% Sólidos	10,0%	12,5%	15,0%

Os resultados dos principais parâmetros (concentração de xilose, ácido acético e furfural no licor do pré-tratamento e concentração de glicose após hidrólise enzimática) são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados do planejamento experimental

% H₂SO₄	% Sol	C_{xilose_PT} (g/L)	C_{Ac.Acético_PT} (g/L)	C_{Furfural_PT} (g/L)	C_{glicose_HE} (g/L)
0,5%	10,0%	5,5	2,7	0,02	5,4
0,5%	15,0%	6,0	2,9	0,02	3,6
1,5%	10,0%	7,5	2,5	0,10	6,1
1,5%	15,0%	13,6	4,4	0,14	4,6
1,0%	12,5%	7,5	3,6	0,02	5,3
1,0%	12,5%	12,1	4,0	0,06	3,2
1,0%	12,5%	5,2	1,8	0,03	5,4

Primeiramente, observa-se que a concentração de ácido acético durante o pré-tratamento é significativo e, em caso de fermentação das pentoses do licor, pode haver alguma interferência no metabolismo. A concentração de glicose é muito baixa e o pré-tratamento não se mostra satisfatório para conferir acessibilidade às enzimas. Avalia-se a significância dos efeitos do teor de ácido sulfúrico, do teor de sólidos e do efeito de interação entre ambos os fatores.

Definindo-se uma significância de 95% para o tratamento estatístico, observa-se que nenhum dos efeitos é estatisticamente significativo pela análise do p-valor. Observa-se, então, um diagrama normal para variáveis codificadas, apresentado na Figura 17. Consideram-se relevantes os valores daqueles efeitos e interações que não se apresentam sobre a reta $y=x$. Segundo esta avaliação, apenas o efeito do teor de ácido sulfúrico é estatisticamente significativo.

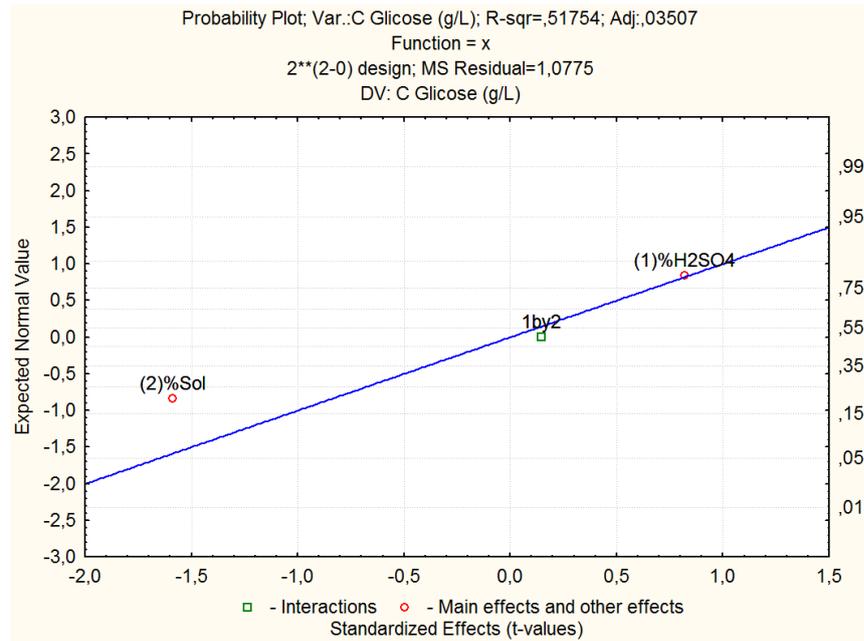


Figura 17: Gráfico dos valores normais esperado em variável codificada

Apesar da não significância dos fatores avaliados, apresenta-se a superfície de resposta obtida na Figura 18 em variáveis codificadas, para que se observe o comportamento da concentração de glicose frente à variação dos fatores mencionados. Observa-se (conforme esperado) que com o aumento de sólidos naturalmente reflete em uma menor concentração final de glicose, provavelmente devido a enquanto o aumento do teor de ácido sulfúrico diminui o teor de glicose, provavelmente sendo muito agressivo aos açúcares liberados.

Calcula-se o rendimento em glicose do processo pré-tratamento/hidrólise enzimática como a razão entre a glicose liberada na hidrólise enzimática e a glicose disponível na biomassa antes do pré-tratamento:

$$\eta_G = \frac{m_{glicose_liberada}}{m_{glicose_Biomassa}}$$

A massa de glicose liberada pode ser escrita como o produto entre o volume de tampão utilizado na hidrólise e a concentração de glicose na fase líquida:

$$\eta_G = \frac{C_{glicose_HE} \times V_{HE}}{m_{glicose_Biomassa}}$$

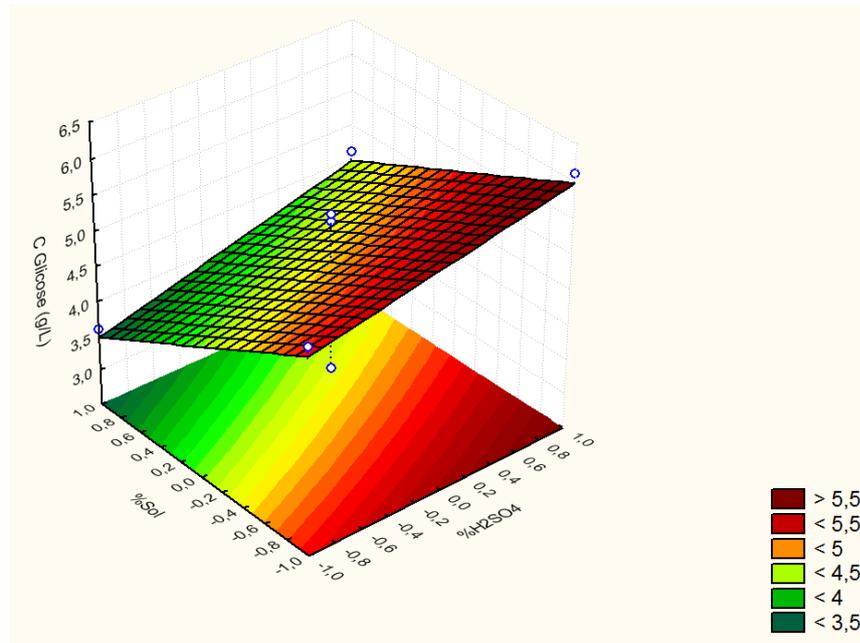


Figura 18: Superfície de resposta que mostra a variação da concentração de glicose em função do teor de sólidos e de ácido sulfúrico

A massa de glicose presente na biomassa é a massa de celulose na biomassa multiplicada pela razão entre as massas moleculares da glicose e celulose, devido à estequiometria da reação de hidrólise (180/162). A massa de celulose, por sua vez, é calculado como o produto entre a massa de biomassa utilizada no processo e o teor de celulose nesta:

$$\eta_G = \frac{C_{glicose_HE} \times V_{HE}}{m_{celulose_Biomassa} \times \frac{180}{162}} = \frac{C_{glicose_HE} \times V_{HE}}{m_{Biomassa} \times w_{celulose} \times \frac{180}{162}}$$

Por fim, a massa de biomassa utilizada é a massa de sólidos secos utilizada na hidrólise enzimática dividido pelo rendimento mássico do pré-tratamento:

$$\eta_G = \frac{C_{glicose_HE} \times V_{HE}}{\frac{m_{Biomassa_HE}}{\eta_{PT}} \times w_{celulose} \times \frac{180}{162}}$$

O rendimento em glicose do processo é apresentado na Tabela 7. Observa-se, conforme já indicavam os dados de concentração, valores bem baixos do rendimento global de glicose.

Tabela 7: Rendimento em glicose do processo pré-tratamento/hidrólise enzimática para os pontos do planejamento experimental

% H ₂ SO ₄	% Sólidos	η _G
0,5%	10,0%	6,0%
0,5%	15,0%	4,1%
1,5%	10,0%	5,8%
1,5%	15,0%	4,4%
1,0%	12,5%	5,4%
1,0%	12,5%	3,3%
1,0%	12,5%	5,6%

Os resultados de baixo desempenho do processo testado levam a formulação de algumas hipóteses:

- I. Baixa severidade do pré-tratamento
- II. Adulteração do coquetel enzimático;
- III. Elevado teor de sólidos no pré-tratamento e hidrólise;
- IV. Baixa dosagem de enzimas;
- V. Coquetel enzimático com baixo teor de β-glicosidase;
- VI. Pré-tratamento inadequado para esta biomassa;
- VII. Elevado teor de lignina e lignina característica do Eucalipto;
- VIII. Biomassa recalcitrante;

A próxima seção deste trabalho é dedicada a testar as hipóteses levantadas, em busca do pré-tratamento adequado para a obtenção de um caldo de fermentação adequado.

4.4 Triagem

Tendo em vista que o pré-tratamento testado não apresentou resultados satisfatórios, foram propostas algumas hipóteses e testes para averigua-las. A seguir, são descritos os 30 testes realizados e respectivos resultados.

Hipótese I: Pré-Tratamento com baixa severidade

Teste I.a: Aumento da temperatura do pré-tratamento a 190 °C e concentrações de ácido em 3%. Ensaio 11, 12, 13 e 14.

Resultado: biomassa carbonizada. Hidrólise enzimática não pôde ser realizada

Teste I.b: Aumento da temperatura do pré-tratamento a 150 °C e concentrações de ácido em 3%. Ensaio 15 e 16

Resultado: Concentração de glicose ao final da hidrólise de 1,5 e 3,8 g/L.

Conclusão: Hipótese descartada. Com o aumento da severidade, as concentrações de glicose não melhoraram significativamente.

Hipótese II: Adulteração do coquetel enzimático

Teste II: Teste do mesmo coquetel enzimático de outro lote. Ensaio 7 (outro coquetel)

Resultado: Outro coquetel apresentou concentração de glicose de 7,7 g/L comparado a aproximadamente 5,0 g/L do coquetel padrão.

Conclusão: Hipótese descartada. A mudança de coquetel não levou ao aumento significativo de glicose.

Hipótese III: Elevado teor de sólidos no pré-tratamento e hidrólise enzimática. O excesso de sólidos pode interferir na difusão dos catalisadores até a biomassa.

Teste III: Realizar pré-tratamento com teor de sólidos (Ensaio 26) menor e manter o teor de sólidos na hidrólise, mas dosar metade no início e metade após 24h (Ensaio 25).

Resultado: Concentração de glicose no ensaio 26 de 1,6 g/L e no ensaio 25 de 5,1 g/L.

Conclusão: Hipótese descartada. Não houve aumento na concentração de glicose.

Hipótese IV: Baixa dosagem de enzimas.

Teste IV: Apesar da dosagem recomendada na literatura, testa-se o aumento de 15 FPU/g para 50 FPU/g (Ensaio 10).

Resultado: Concentração de glicose no ensaio 10 de 6,0 g/L.

Conclusão: Hipótese descartada. Mesmo com o aumento na dosagem, a concentração permanece baixa.

Hipótese V: Coquetel com baixo teor de β -glicosidase.

Teste V: Por sugestão da Prof^a Laura Tovar (Universidade Federal de Santa Maria) e Prof^a Solange Mussato (Technical Institute of Denmark), testa-se suplementar o coquetel com β -glicosidase (Ensaio 22).

Resultado: Concentração de glicose no ensaio 22 de 3,7 g/L.

Conclusão: Hipótese descartada. Concentração baixa de glicose.

Hipótese VI: Pré-tratamento inadequado para a biomassa.

Teste VI: Avaliou-se a combinação de pré-tratamento seguido de deslignificação (ensaios 1 a 6), com peróxido de hidrogênio com pH 11,5 (ensaio 28), ácido sulfúrico seguido de peróxido de hidrogênio (Ensaio 23) e peróxido de hidrogênio seguido de ácido sulfúrico (Ensaio 24).

Resultado: Para diversas condições de pré-tratamento (ensaios 1, 3 e 5) verificou-se que seu correspondente com hidróxido de sódio (ensaios 2, 4 e 6 respectivamente) apresentaram melhora parcial, mas ainda insatisfatória, na liberação de glicose. O melhor resultado foi de 8,8 g/L de glicose. Peróxido de hidrogênio apenas (70 °C, pH 11,5 e 1h de batelada) levou a uma liberação de 7,4 g/L. Combinações entre peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico levaram concentrações de glicose de 5,8 g/L (ensaio 23) e 8,9 g/L (ensaio 24).

Conclusão: Hipótese mantida. Apesar da melhoria não tão significativa, verificou-se que pré-tratamentos que solubilizam a lignina promovem aumento na liberação de glicose. Deve se ter em mente que a lignina obtida com o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio é solubilizada, dificultando seu uso como combustível.

Hipótese VII: Elevado teor de lignina e estrutura da lignina do eucalipto dificultam hidrólise

Teste VII: Em testes variando-se o teor de hidróxido de sódio – agente removedor de lignina – averiguou-se a liberação de glicose. Realizou-se um controle sem deslignificação (ensaio 19), deslignificação com teor de base 1% (Ensaio 20), deslignificação com teor de base 4% (Ensaio 17) e replicata do ensaio 17 com teor de sólidos inferior durante deslignificação.

Resultado: Ensaio 19, liberação de 6, g/L de glicose. Ensaio 20, 3,9 g/L. Ensaios 17 e 18, liberação de 10,4 e 10,1 g/L de glicose

Conclusão: Hipótese mantida. Apesar da melhoria não tão significativa, verificou-se que pré-tratamentos que solubilização maior da lignina promove maior liberação de glicose.

Hipótese VIII: Biomassa recalcitrante

Teste VIII: Comparou-se pré-tratamento ácido em eucalipto com bagaço de cana de açúcar (ensaio 8 e 10)

Resultado: Pré-tratamento ácido com bagaço de cana de açúcar liberou 44 g/L e 60 g/L de glicose

Conclusão: Hipótese mantida. O pré-tratamento ácido funciona eficazmente com outras biomassas.

Os ensaios permitiram chegar a algumas conclusões importantes. Apresenta-se a Tabela 8 com um detalhamento maior de todas as condições e resultados obtidos. O pré-tratamento ácido não é adequado para o eucalipto, deixando duas possíveis explicações: a celulose do eucalipto é recalcitrante, sendo necessário um ensaio de DRX para avaliar este ponto e o teor e estrutura de lignina dificultam a sua hidrólise.

Sugere-se que, em trabalhos futuros, sejam testados pré-tratamentos mais severos, como explosão a vapor, o que ataquem outra fração da biomassa, como o AFEX ou Peróxido de Hidrogênio que atacam a lignina. Resultados mostram que condições mais severas no pré-tratamento ácido não foram eficazes.

Tabela 8: Ensaios da etapa de triagem - Condições de Pré-tratamento ácido, Designificação, Hidrólise enzimática e concentração de glicose após hidrólise

Ensaio	Biomassa	Pré-Tratamento				Designificação				Hidrólise Enzimática			Observação	Glicose (g/L)
		% DM	% H ₂ SO ₄	t (min)	T (°C)	% DM	% NaOH	t (min)	T (°C)	% DM	CE (FPU/g)	Coquetel		
1	Eucalipto	15,0%	1%	60	121					10%	15	CCT2		3,7
2	Eucalipto	15,0%	1%	60	121	15%	2%	60	121	10%	15	CCT2		6,0
3	Eucalipto	12,5%	2%	105	121					10%	15	CCT2		5,0
4	Eucalipto	12,5%	2%	105	121	15%	2%	60	121	10%	15	CCT2		8,8
5	Eucalipto	10,0%	3%	150	121					10%	15	CCT2		4,6
6	Eucalipto	10,0%	3%	150	121	15%	2%	60	121	10%	15	CCT2		7,7
7	Eucalipto	12,5%	2%	105	121	15%	2%	60	121	10%	15	CCT2- Lote 2		12,5
8	Bagaço de Cana	12,5%	2%	105	121	15%	2%	60	121	10%	15	CCT2		44,0
9	Bagaço de Cana	12,5%	2%	105	121	15%	2%	60	121	10%	15	CCT2- Lote 2		60,0
10	Eucalipto	12,5%	2%	105	121	15%	2%	60	121	10%	50	CCT2		6,0
11	Eucalipto	12,5%	3%	15	190					10%				Carbonizada
12	Eucalipto	12,5%	3%	30	190					10%				Carbonizada
13	Eucalipto	6,0%	3%	15	190					10%				Carbonizada
14	Eucalipto	6,0%	3%	30	190					10%				Carbonizada
15	Eucalipto	12,5%	3%	15	150	15%	2%	60	121	10%	15	CCT2		3,8
16	Eucalipto	12,5%	3%	30	150	15%	2%	60	121	10%	15	CCT2		1,5
17	Eucalipto	12,5%	2%	105	121	10%	4%	60	121	10%	15	CCT2		10,4
18	Eucalipto	12,5%	2%	105	121	15%	4%	60	121	10%	15	CCT2		10,1
19	Eucalipto	12,5%	1%	60	121					10%	15	CCT2		6,9
20	Eucalipto	12,5%	1%	60	121	15%	1%	60	121	10%	15	CCT2		3,9
21	Eucalipto	12,5%	1%	60	121					10%	15	CCT2		3,2
22	Eucalipto	12,5%	1%	60	121					10%	15	CCT2+ β Glic		3,7
23	Eucalipto	12,5%	3%	90	121					10%	15	CCT2	PT H₂SO₄ + PT H₂O₂	5,8

24	Eucalipto	12,5%	3%	90	121		10%	15	CCT2	PT H ₂ O ₂ + PT H ₂ SO ₄	8,9
25	Eucalipto	12,5%	3%	90	121		10%	15	CCT2	sólidos dosados	5,1
26	Eucalipto	12,5%	3%	90	121		10%	15	CCT2	sólidos dosados	1,8
27	Eucalipto	12,5%	3%	90	121		10%	15	CCT2	Overnight Ácido	10,3
28	Eucalipto						10%	15	CCT2	Peróxido	7,4
29	Eucalipto						10%	15	CCT2+β Glic+Xil.	Peróxido	13,9
30	Eucalipto						10%	15	CCT2		0,0

4.5 Caracterização das correntes de processo

Para uma melhor compreensão das operações de pré-tratamento e deslignificação, foi realizada uma análise completa de cada amostra, consistindo na determinação de sua composição química e recalcitrância da biomassa via DRX. O pré-tratamento foi feito com teor de sólidos de 15%, teor de ácido de 3%, tempo de 120 min a 121 °C. A deslignificação foi feita com teor de sólidos de 15%, teor de base de 2%, tempo de 60 min a 121 °C. Os resultados são apresentados na Tabela 9

Observa-se que o pré-tratamento ácido é, de fato, muito eficaz em remover as hemiceluloses do eucalipto. Após esta etapa, toda a fração de hemicelulose é removida. Já a etapa de deslignificação é muito branda, praticamente não remove a lignina presente da biomassa pré-tratada. É possível que o teor de lignina seja a causa da reação de hidrólise possuir conversões baixíssimas.

Tabela 9: Análise composicional após cada etapa do processo de pré-tratamento de eucalipto

Biomassa	In Natura	Pré-Tratada	Deslignificada
Glicanas	53,4%	67,2%	68,4%
Xilanas	14,9%	0,0%	0,0%
Grupos Acetila	2,2%	0,2%	0,2%
Lignina	25,6%	30,5%	28,3%
Extrativos	0,3%	0,0%	0,0%
Cinzas	2,1%	0,5%	0,9%

Segundo o protocolo do Capítulo 03, realiza-se uma análise de difração de raios-x apresentado na Figura 19 para averiguar a cristalinidade da biomassa após cada processo. Na Tabela 10 são apresentados os valores de intensidade mínimo e máximos utilizados para calcular o índice de cristalinidade e comparação com o bagaço de cana de açúcar.

Conforme esperado, a cristalinidade da biomassa de fato aumenta após os pré-tratamentos que removem frações amorfas, como hemicelulose e lignina. Talvez, o

valor de cristalinidade da biomassa após pré-tratamentos seja muito elevado e esta recalcitrância impossibilita a ação das enzimas.

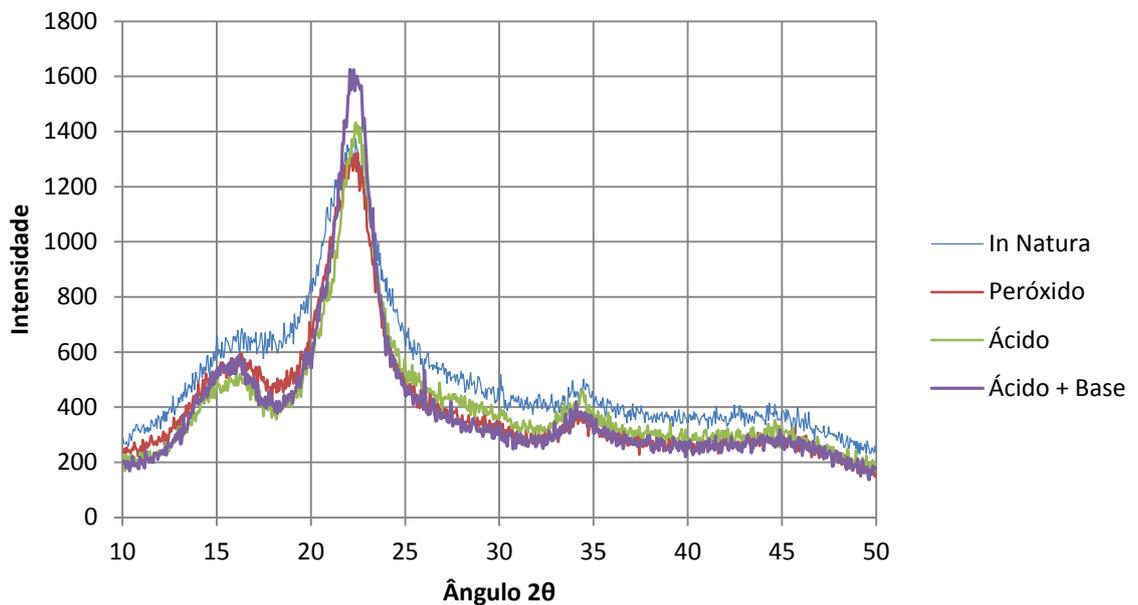


Figura 19: Difratograma de raios-x para as biomassa in natura e após diversos pré-tratamentos.

Tabela 10: Valores dos vales e picos do difratograma, índice de cristalinidade do eucalipto e do bagaço de cana de açúcar

	In Natura	Peróxido	Base+Ácido	Ácido
Mínima Intensidade ($18 < 2\theta < 19$)	576,9	409,2	377,1	356,2
Máxima Intensidade ($22 < 2\theta < 23$)	1373,1	1322,6	1625,4	1431,8
I Cristalinidade	0,58	0,69	0,77	0,75
I Crist. Bagaço	0,48	---	0,68	0,60

4.6 Produção em Biorreator e Caracterização

Por fim, definem-se as condições de pré-tratamento e hidrólise enzimática para a produção do hidrolisado que serviu de substrato para as próximas etapas. Apesar das melhorias trazidas pelos ensaios com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, estas foram consideradas pouco relevantes e optou-se por uma operação mais simples na produção de hidrolisado. O caldo final foi suplementado com glicose sintética para que a concentração de 120 g/L seja atingida para o início das fermentações.

4.6.1 Produção

Eucalipto foi pré-tratado em frascos Schott com teor de sólidos de 15%, teor de ácido de 1,0%, durante 1h e 121 °C. Após resfriamento dos frascos Schott, foi feita uma filtração e o licor rico em xiloses foi conservado para futuros experimentos. Os sólidos, a sua vez, foram lavados com água abundante até que o seu pH atingisse neutralidade. Os sólidos foram secados a temperatura ambiente por convecção natural até que sua umidade alcançasse valor inferior a 10%.

Posteriormente, a hidrólise enzimática ocorreu em reator de vidro encamisado, apresentado na Figura 20. Utilizou-se uma carga de enzimática de 15 FPU/mL da enzima Cellic CTec 2, carga de sólidos de 10%, agitação 250 RPM, temperatura de operação 50 °C e tempo de batelada de 48h, conforme recomendado pelo fornecedor de enzimas e justificado no Capítulo 02. Ao final, separava-se as fases sólida e líquida via filtração simples, conservando o líquido a -4 °C até a data de uso. O sólido foi descartado.

4.6.2 Caracterização do Licor

Dos licores coletados, foram analisadas seis amostras aleatoriamente e os resultados são apresentados na Tabela 11. As informações corroboram as informações obtidas anteriormente. A xilose é extraída praticamente em sua totalidade no pré-tratamento, os níveis de furfural e 5-HMF são bem abaixo dos níveis tóxicos aos microrganismos, enquanto o licor de pré-tratamento possui elevado teor de ácido acético. A liberação de glicose é muito baixa, evidenciando que o pré-tratamento com ácido diluído não confere a acessibilidade necessária para as enzimas converterem celulose à glicose. Observou-se também que para 1 kg de biomassa pré-tratada, são produzidos 3 L de licor rico em C5 (após o pré-tratamento) e 4,5 L de licor rico em C6 (após hidrólise enzimática).



Figura 20: Reator utilizado para a reação de hidrólise enzimática

4.7 Considerações Finais

Neste capítulo puderam-se avaliar diversos pré-tratamentos no eucalipto e como conclusões principais, verificou-se que a ação do ácido diluído não é tão eficaz quando outros pré-tratamentos reportados na literatura ou outras biomassas. Isto se deve, provavelmente, a recalcitrância inerente do eucalipto e/ou ao teor e estrutura da lignina que é dificilmente removida. Definiu-se, por fim, as condições de produção do hidrolisado a ser fermentado.

Tabela 11: Composição dos licores provenientes do pré-tratamento e hidrólise enzimática.

Fonte	Composição do Licor	
	Pré-Tratamento	Hidrólise Enzimática
Substância		
Glicose	1,5 ± 0,2	2,8 ± 0,1
Celobiose	3,3 ± 0,7	4,1 ± 0,2
Xilose	17 ± 2	0,59 ± 0,03
Arabinose	0,3 ± 0,1	0,0252 ± 0,0001
Ácido Acético	5,4 ± 0,6	0,246 ± 0,004
Furfural	0,16 ± 0,06	---
5-HMF	0,0018 ± 0,0009	---
Ácido Vanilínico	0,060±0,001	0,060±0,001
Ácido Siringico	0,471±0,001	0,471±0,001
Vanilina	0,116±0,001	0,116±0,001
Siringaldeído	0,341±0,001	0,341±0,001
Ácido Cumárico	0,338±0,001	0,338±0,001
Cinamaldeído	---	---

Capítulo 05 - Ensaios de Fermentação

5.1 Introdução

Com a definição das condições operacionais de pré-tratamento e hidrólise enzimática, parte-se para a atividade central deste trabalho: os estudos de fermentação para a produção de etanol e de ABE, buscando explorar os pontos de flexibilização entre os dois produtos no contexto de uma planta Kraft.

Neste capítulo, serão apresentados os resultados dos ensaios de fermentação com os microrganismos *Saccharomyces cerevisiae* e *Clostridium beijerinckii* em diversos meios e em três regimes de operação: (1) batelada convencional, (2) batelada com extração a vácuo do produto e (3) batelada alimentada com extração a vácuo do produto, apenas para a produção de etanol. Com os resultados obtidos, o capítulo se conclui com uma análise de flexibilização do processo citado no Capítulo 02.

5.2 Procedimento experimental

5.2.1 Produção de Etanol

Após a ativação da cepa, descrita no capítulo 03, deram-se início aos ensaios de produção de etanol consistem em três etapas principais:

1. Pré-Inóculo: fermentação cujo objetivo é o crescimento celular em ambiente livre de substâncias que inibam seu crescimento. Esta etapa sempre foi realizada em frascos erlenmeyer.

2. Inóculo: fermentação cujo objetivo é o crescimento celular em ambiente similar ao da etapa de fermentação, de modo a habituar os microrganismos. Esta etapa sempre foi realizada em frascos erlenmeyer. A razão entre volume adicionado de pré-inóculo e volume final de inóculo é de 10%.

3. Fermentação: etapa destinada à produção de etanol, na qual foram realizados os ensaios para obtenção de dados que permitirão avaliar a flexibilidade

do processo etanol-ABE. Esta etapa ocorreu em frascos erlenmeyer e em biorreator, cujo aparato será descrito posteriormente. A razão entre volume adicionado de inóculo e volume inicial de caldo de fermentação é de 10%, e a densidade óptica a ser adicionada é de 1,0.

O início de todas as etapas foi realizado dentro de uma bancada de fluxo laminar vertical (Pachane, Modelo PA50) esterilizada com etanol 70% e luz ultravioleta durante 30 min. Para o pré-inóculo, utilizou-se frascos erlenmeyers aletados para garantir aeração e a fermentação ocorreu em incubadora com controle de temperatura (Marconi, modelo MA380). Todas as etapas ocorreram a 35 °C (Andrade 2012). A composição do meio de fermentação, nível de agitação, tempo de reação e amostragem foram definidos para cada experimento e serão apresentados ao longo deste capítulo.

5.2.2 Produção de ABE

Todos os ensaios relacionados à fermentação ABE ocorreram no centro de pesquisa OARDC, no campus de Wooster da Ohio State University, sob a supervisão do Prof. Dr. Thaddeus C. Ezeji. Após a ativação da cepa, descrita no capítulo 03, deram-se início aos ensaios de produção de ABE consistem em três etapas principais:

1. Pré-Inóculo: fermentação cujo objetivo é fazer com que a bactéria saia da forma de esporos para a forma vegetativa em um meio de cultura livre de substâncias que inibam seu crescimento. Esta etapa sempre foi realizada em tubos de ensaio.

2. Inóculo: fermentação cujo objetivo é o crescimento celular, fazendo-os chegar à fase exponencial em um meio de cultura livre de substâncias que inibam seu crescimento. Esta etapa sempre foi realizada em frascos Schott-duran. A razão entre volume adicionado de pré-inóculo e volume final de inoculo é de 10%.

3. Fermentação: etapa destinada à produção de ABE, na qual foram realizados os ensaios para obtenção de dados que permitirão avaliar a flexibilidade do processo etanol-ABE. Esta etapa ocorreu em frascos Schott-Duran e em

biorreator, cujo aparato será descrito posteriormente. A razão entre volume adicionado de inóculo e volume inicial de caldo de fermentação é de 6%, e a densidade óptica a ser adicionada é de 0,9.

O início de todas as etapas foi realizado dentro de uma bancada de fluxo laminar vertical esterilizada com etanol 70% e luz ultravioleta durante 30 min. O pré-inóculo e inóculo foram realizados em câmara de anaerobiose (Coy Laboratory Products Inc., Ann Arbor, MI). Todas as etapas ocorreram a 35 °C, segundo indicação do fornecedor da cepa. A composição do meio de fermentação, tempo de reação e amostragem foram definidos para cada experimento e serão apresentados ao longo deste capítulo.,

5.2.3 Análise dos resultados.

O crescimento celular foi acompanhado por leitura em espectrofotômetro, com luz com comprimento de onda de 680 nm (Agilent Technologies, Agilent Cary 60 UV-Vis, modelo G6860A). A análise dos componentes presentes no caldo de fermentação etanólica (glicose, celobiose, xilose, arabinose, etanol, glicerol, ácido acético, fufural e 5-HMF) foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE ou HPLC (Agilent Technologies, Agilent 1260 infinity, detectores RID e DAD). A análise dos carboidratos presentes no caldo de fermentação ABE (glicose, celobiose, xilose, arabinose) foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE ou HPLC (AllianceBio – Water 2796, detector ELS 2424). Para a medição de inibidores, também utilizou-se CLAE (AllianceBio – Water 2796, detector Photodiode array 2992). A análise de produtos de fermentação (n-butanol, acetona, etanol, ácido butírico e ácido acético) foi feita via cromatografia gasosa (GC agilent 7890 A G 3440 A, Detector FID)

5.3 Definição do meio de cultura e tempos de reação

5.3.1 Produção de Etanol

Para o pré-inóculo, optou-se por um meio sintético, propício para o crescimento do microrganismo sem a presença de substâncias que o pudessem

afetar negativamente seu desenvolvimento. Sua composição é apresentada na Tabela 12 (Andrade 2012).

Tabela 12: Composição do meio sintético utilizado no pré-inóculo

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	20,00
Extrato de Levedura	5,00
K ₂ HPO ₄	5,00
NH ₄ Cl	1,50
KCl	1,15
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,65

Após a ativação da cepa, descrita no Capítulo 03, realizou-se um ensaio de crescimento em meio sintético para avaliar o comportamento da população do microrganismo e definir o tempo de pré inóculo. Para tanto, inoculou-se uma massa de células coletadas dos estoques em tubos inclinados em 200 mL de meio sintético. O crescimento celular é apresentado na Figura 21 e verifica-se que o final da fase exponencial aproximadamente em 12h. Opta-se, desta forma, por este tempo de batelada para o pré-inóculo.

Para a avaliação do inóculo, comparou-se inicialmente a necessidade de suplementação. Partindo-se de pré-inóculos conforme aqueles descritos, realizaram-se inóculos com duas composições distintas (1) hidrolisado de eucalipto com sua concentração de glicose corrigida a 60 g/L e cloreto de amônio (1,5 g/L) ou (2) hidrolisado de eucalipto com sua concentração de glicose corrigida a 60 g/L e composição igual a descrita na Tabela 12. Os resultados são apresentados na Figura 22. Observa-se que, conforme esperado, a suplementação cria condições propícias para o crescimento do microrganismo e que a suplementação de cloreto de amônio não cria condições para a metabolização total do substrato em 12h, conforme desejado para a etapa de inoculo.

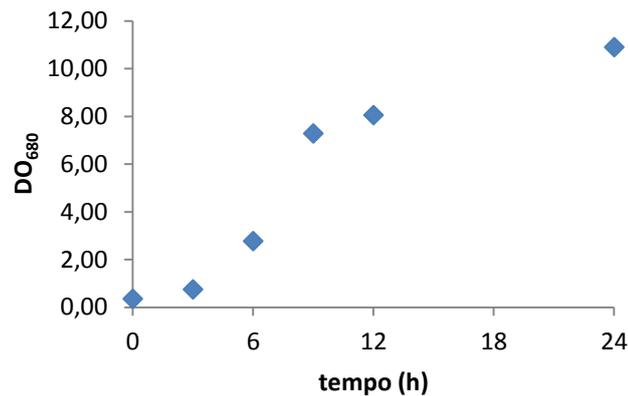


Figura 21: Crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético.

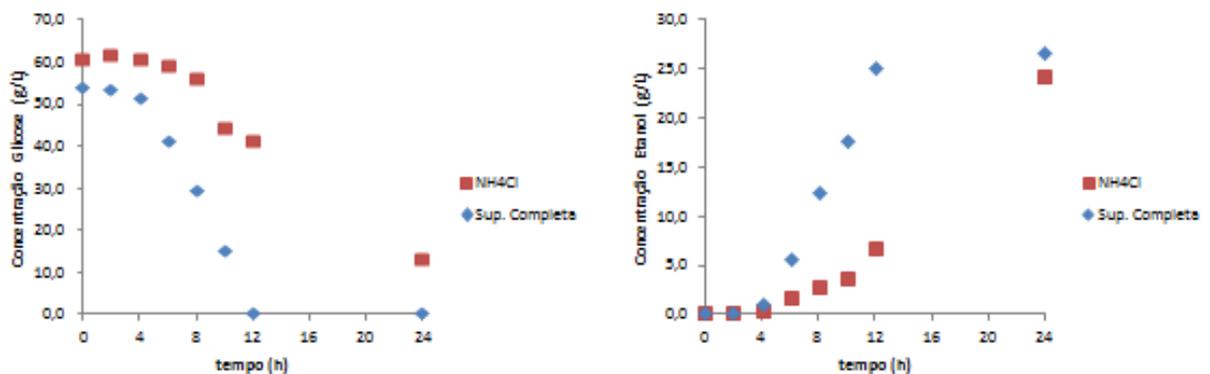


Figura 22: comparação entre consumo de glicose de produção de etanol em hidrolisado de eucalipto com diferentes suplementações.

Após determinar que a suplementação seria completa, realizou-se um ensaio com concentração 20 g/L iniciais de glicose para avaliar o tempo de inoculo. O ensaio é realizado em duplicata e seus resultados são apresentados na Figura 23. Observa-se que o tempo de 12h é o suficiente para a quase finalização da fase exponencial e, portanto, opta-se por um tempo de inoculo de 12h.

Com os meios de cultura definidos e o tempo de pré-inóculo e inoculo definidos, ainda falta definir o tempo de fermentação. Realizam-se ensaios de fermentação em triplicata durante 60h e com concentração inicial de glicose de 120 g/L, utilizando os procedimentos de pré-inóculo e inoculo descritos. Inocula-se concentração de levedura equivalente a uma unidade de densidade óptica. Os resultados de crescimento celular são apresentados na Figura 24 e, a partir destes, observa-se que o crescimento celular (e, portanto a produção de etanol, uma vez que

neste caso ocorre crescimento associado) conclui-se em 24h. Sendo assim, define-se o tempo de fermentação batelada como um dia. Optou-se por este tempo de fermentação. Opta-se por um tempo de fermentação superior ao utilizado industrialmente, de modo a estudar a sua cinética na totalidade.

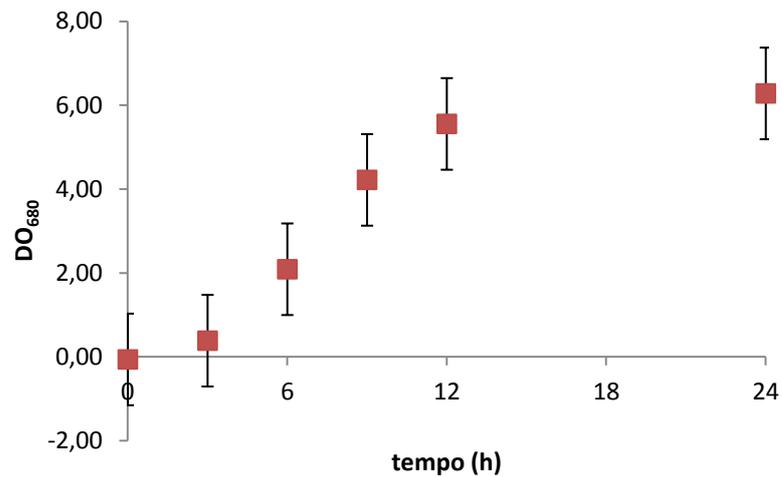


Figura 23: Ensaio de crescimento em meio definido para inóculo.

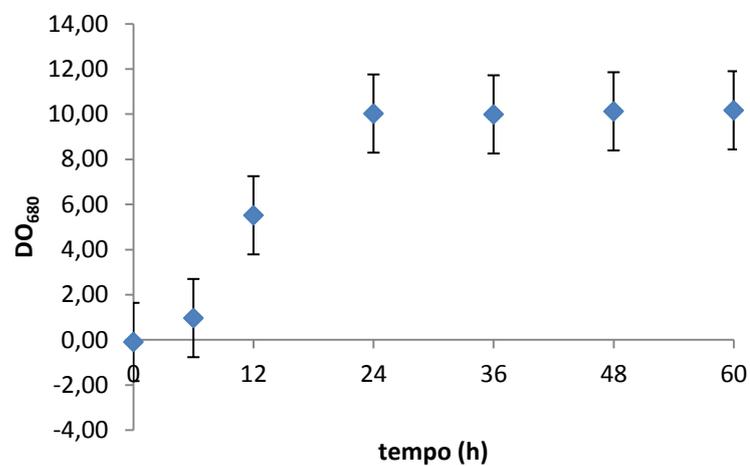


Figura 24: Ensaio de crescimento em meio definido para fermentação.

5.3.2 Produção de ABE

As etapas de pré-inóculo e inóculo foram realizadas em meio TGY, que eram preparados e deixados por 12h na câmara de anaerobiose para que ocorresse a desoxigenação e cuja composição é apresentada na Tabela 13. A partir da solução estoque de esporos, coletou-se 400 μL , em um eppendorf e ativou-se o microrganismo com um choque térmico de 70 °C por 10 min, seguido de um banho em gelo por 2 min. O tubo eppendorf foi levado para dentro da câmara e seu conteúdo transferido para um tubo de ensaio com 10 mL de meio TGY. Aguardou-se que a densidade óptica do meio, avaliada em espectrofotômetro (DU 800 spectrophotometer - Beckman Coulter Inc.) a 600 nm de comprimento de onda, alcançasse um valor superior a 0,9 (aproximadamente 12h). Em seguida, transferiam-se os 10 mL de pré-inóculo para um frasco com 90 mL de meio TGY para o inóculo. Esperava-se que a densidade óptica também alcançasse um valor igual ou superior a 0,9 (cerca de 3h) para que fosse feita a transferência para o caldo de fermentação.

Tabela 13: Composição do meio TGY (Mariano, Qureshi, et al. 2012)

Componentes	Concentração (g/L)
Triptona	30
Glicose	20
Extrato de Levedura	10
L-cisteína	1

Já a terceira etapa – chamada de fermentação – foi realizada em dois hidrolisados distintos: em licor C₅ (rico em pentoses, obtido após o pré-tratamento ácido) e em licor C₆ + C₅, composto pelos líquidos obtidos da hidrólise enzimática e do pré-tratamento ácido. A proporção dos licores segue a razão 1,5:1 (C₆:C₅) obtida no Capítulo 04.

O licor C₅ passou por um processo de detoxificação *in situ* por overliming (Qureshi et al. 2010), que consiste em corrigir o pH do licor com hidróxido de cálcio até 10, adicionar 1 g/L de sulfeto de sódio e manter o meio a 90 °C por 30 min. Após o resfriamento do meio, o pH era corrigido a 6,8 – valor que foi usado durante as fermentações. A composição dos meios e soluções utilizadas nas fermentações é

apresentada na Tabela 14, Tabela 15, Tabela 16 e Tabela 17. O tempo de fermentação é mantido por 72 h (Mariano, Qureshi, et al. 2012).

Tabela 14: Composição dos meios de fermentação utilizados

Componentes	Concentração	Concentração
	Licores C6 + C5	Licores C5
Razão Licor C ₆ :C ₅	1,5	0,0
Glicose (g/L)	46,2	0,0
Xilose (g/L)	13,8	60,0
Extrato de Levedura (g/L)	1	1
Solução Tampão (v/v)	8,3%	8,3%
Solução de Minerais (v/v)	1%	1%
Solução de Vitaminas (v/v)	1%	1%
Inóculo (v/v)	6%	6%

Tabela 15: Composição da solução tampão

Componentes	Concentração (g/L)
KH ₂ PO ₄	6,0
K ₂ HPO ₄	6,0
Acetato de amônia	26,4
2-(N-morpholino)-ethane sulfonic acid (MES)	84,0

Tabela 16: Composição da solução de vitaminas

Componentes	Concentração
Ácido p-aminobenzóico	0,1 g/L
Tiamina	0,1 g/L
Biotina	0,01 g/L

Tabela 17: Composição da solução de minerais

Componentes	Concentração
MgSO ₄ .7H ₂ O	20 g/L
MnSO ₄ .1H ₂ O	1 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g/L
NaCl	1 g/L

5.4 Ensaios de Extração

5.4.1 Extração de Etanol

Para determinar-se a periodicidade e duração da aplicação de vácuo no reator, para remover o produto durante a fermentação, realiza-se um ensaio preliminar de extração de álcool etílico do sistema binário água-etanol. Para tanto, utiliza-se o biorreator (New Brunswick, modelo BioFlo Celligen 310) em escala bancada e aparato apresentado na Figura 25.

No biorreator, então conectados um agitador (que opera sempre a 25 rpm); um sistema de condensação que condensa possíveis produtos que evaporam, mas que permite a passagem de incondensáveis, como dióxido de carbono produzido durante a fermentação. Por este mesmo duto, injeta-se gás nitrogênio para recompor a pressão no interior do biorreator depois de concluída a sessão de vácuo. Ainda no biorreator, existe um sistema de troca térmica (que manteve o meio a 35 °C em todos os ensaios), utilizando água como utilidade em um sistema de coleta estéril de amostras, bombas peristálticas que conectam um estoque de meio ao interior do reator e o sistema supervisorio.

Existe uma saída do biorreator que o conecta ao balão de coleta do produto. Quando o vácuo é aplicado, a pressão no interior do sistema alcança -26,5 inHg manométricos, que corresponde a 0,116 bar, 11,6 kPa ou 86 mmHg absolutos. Nestas condições, o meio reacional entra em ebulição e é condensado pelo condensador, que é mantido a -10 °C pelo etileno glicol refrigerado pelo banho termostático (Marconi, MA184). Os incondensáveis – que contém etanol em sua composição – seguem pelo topo do condensador, passam pela bomba a vácuo (Fisatom, 826, 370 W) e, por fim, mergulham em 500 mL água para serem absorvidos em uma armadilha e quantificados posteriormente.

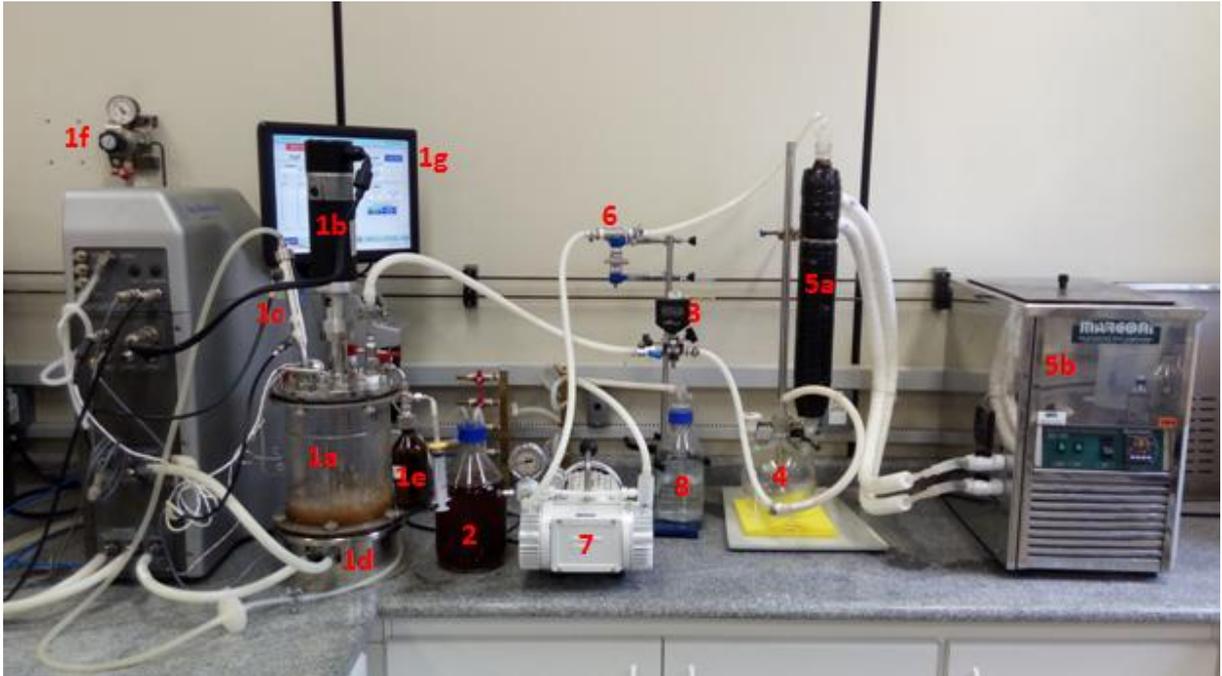


Figura 25: Aparato experimental utilizado nos ensaio de extração e fermentação com aplicação de vácuo - 1. Conjunto do biorreator; 1a. Biorreator; 1b. Agitador; 1c. Condensador, duto de alívio de pressão e alimentação de gás nitrogênio; 1d. Entrada de água de aquecimento/resfriamento; 1e. Sistema de amostragem; 1f. Válvula de alimentação de gás nitrogênio; 1g. Sistema supervisorio e suporte de bombas peristálticas de alimentação. – 2. Meio para operação semi-batelada – 3. Vacuômetro – 4. Balão de coleta de etanol extraído – 5. Sistema de condensação; 5a. Condensador espiral; 5b. Banho termostático com etileno glicol – 6. Válvula agulha – 7. Bomba a vácuo – 8. Armadilha de água para absorver o etanol não condensado.

Partindo-se de 2000 mL de solução aquosa de etanol a 22,8 g/L, aplicou-se vácuo durante 2h, coletando-se alíquotas do interior do reator a diversos tempos. No tempo final, coletaram-se alíquotas do reator, balão e armadilha. O etanol foi quantificado e os resultados da taxa de extração são apresentados na Figura 26. Observa-se uma diminuição na taxa de extração após 1h de operação, quando a concentração de etanol atinge cerca de 10 g/L. Como não há intenção em deixar que o etanol ultrapasse valores que causam inibição (cerca de 50 g/L) e tampouco que todo o etanol seja extraído, nos ensaios de fermentação, o vácuo será aplicado durante 1h antes que a concentração alcance valores próximos da inibição.

Para avaliar as perdas do sistema de fermentação apresentado, realizou-se um balanço material do componente etanol, cujos resultados são apresentados na Tabela 18. A partir dos dados, observa-se que as perdas são baixas, representando apenas

0,2% do etanol total. Após 2h de operação, extraiu-se 84,7% de etanol do reator, sendo que deste valor, 65,8% são condensados e capturados no balão, enquanto 18,6% são absorvidos na armadilha. A razão entre massa de etanol condensado no balão e absorvido pela água da armadilha é de 3,52 e, portanto, o uso da armadilha é fundamental para quantificar a extração de etanol do sistema.

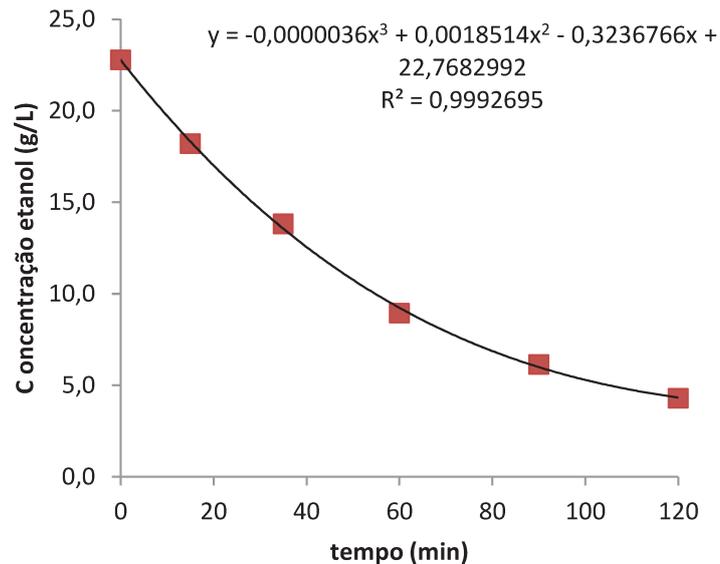


Figura 26: Resultados do ensaio de extração de etanol do reator

Tabela 18: Balanço de massa para o componente etanol no ensaio de extração

Corrente	Volume (mL)	Concentração (g/L)	Massa (g)
Entrada - Reator	2000	22,8	45,6

Saída	2000	---	45,5
Reator	1627	4,3	7,0
Balão	373	80,4	30,0
Armadilha	500	17,0	8,5

Perdas			0,10

5.4.2 Extração de ABE

Para os ensaios de extração de ABE, tomaram-se as informações publicadas nos artigos "Assessment of in situ butanol recovery by vacuum during acetone butanol ethanol (ABE) fermentation" (Mariano, Qureshi, et al. 2012) e (Mariano, Filho, et al. 2012) e "Energy requirements during butanol production and in situ recovery by cyclic

vacuum”, cujos dados experimentais foram obtidos no mesmo aparato experimental utilizado para a realização das fermentações ABE do atual trabalho, apresentado na Figura 27.



Figura 27: Aparato experimental utilizado nos ensaio de extração e fermentação com aplicação de vácuo, composto por biorreator e sistema supervisorío e suporte de bombas peristálticas de alimentação; balão de coleta de etanol extraído; sistema de condensação (condensador espiral e banho termostático com etileno glicol); Bomba a vácuo; armadilha de água para absorver o etanol não condensado e cilindro de gás nitrogênio.

Os artigos citados concluem que as melhores condições para a extração de n-butanol via vácuo são quando sua concentração é, no mínimo, 5 g/L e que o vácuo dure 2h quando operado intermitentemente.

5.5 Fermentação Batelada

5.5.1 Produção de Etanol

As fermentações em batelada foram realizadas em triplicata e em escala bancada, em frascos erlenmeyer com volumes de 200 mL, seguindo o protocolo explicitado. Os resultados de crescimento celular são apresentados Figura 28, onde se percebe de modo bem definido as fases de crescimento celular (fase de latência, crescimento exponencial, crescimento retardado e fase estacionária). Os dados

experimentais são ajustados a um modelo cuja equação regente é $X(t) = a + \frac{b-a}{a+(\frac{t}{c})^p}$, com o auxílio do software Origin 8.1 com coeficiente de determinação de 0,9946. O modelo de Monod não representa bem o comportamento desta população e, portanto, opta-se por um modelo logístico. Os resultados são apresentados na Figura 29, e os parâmetros do modelo são apresentados na Tabela 19

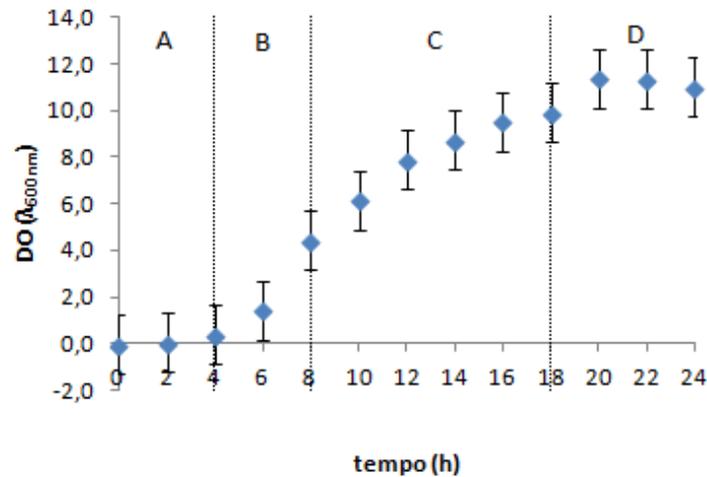


Figura 28: Crescimento celular médio dos ensaios de fermentação em batelada. Em evidência, as fases de crescimento celular (A = fase de latência; B = crescimento exponencial; C = crescimento retardado e; D = fase estacionária)

Tabela 19: Parâmetros do modelo ajustado aos dados experimentais de crescimento celular

Parâmetro	Valor/significado
X(t)	Concentração celular (Unidades Arbitrárias - DO)
t	horas
a	11,97
b	-0,15
c	9,86
p	3,15

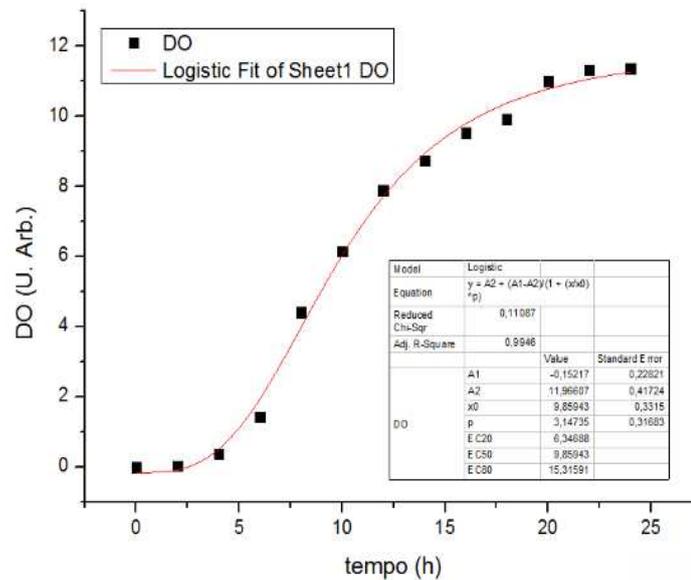


Figura 29: Ajuste do modelo logístico aos dados experimentais de crescimento celular

Apresenta-se, na Figura 30, a variação das concentrações de substrato e produtos ao longo do tempo de fermentação. O consumo de substrato é estatisticamente zero a partir da hora 20, mesmo momento em que a produção de etanol e crescimento celular se estabilizam, uma vez que crescimento e produção de produto são associados para esta cultura. Observa-se que a partir de 12h de reação, a concentração de etanol alcança 20 g/L e que, durante a fase exponencial, a cada 3h, a produção aumenta em cerca de 15 g/L. Estes valores serão importantes na definição da periodicidade e início da aplicação do vácuo na próxima seção.

Na Figura 31, observa-se a relação entre concentração celular e concentração de substrato e relação entre concentração de produto e concentração de substrato. Ajustam-se linearmente os pontos coletados após a fase de latência e o oposto dos coeficientes angulares de cada gráfico é definido como o rendimento biomassa celular/substrato ($Y_{X/S}$, em UA*L/g glicose) e rendimento produto/substrato ($Y_{P/S}$, em g etanol/g glicose), cujos valores são respectivamente 0,069 e 0,491.

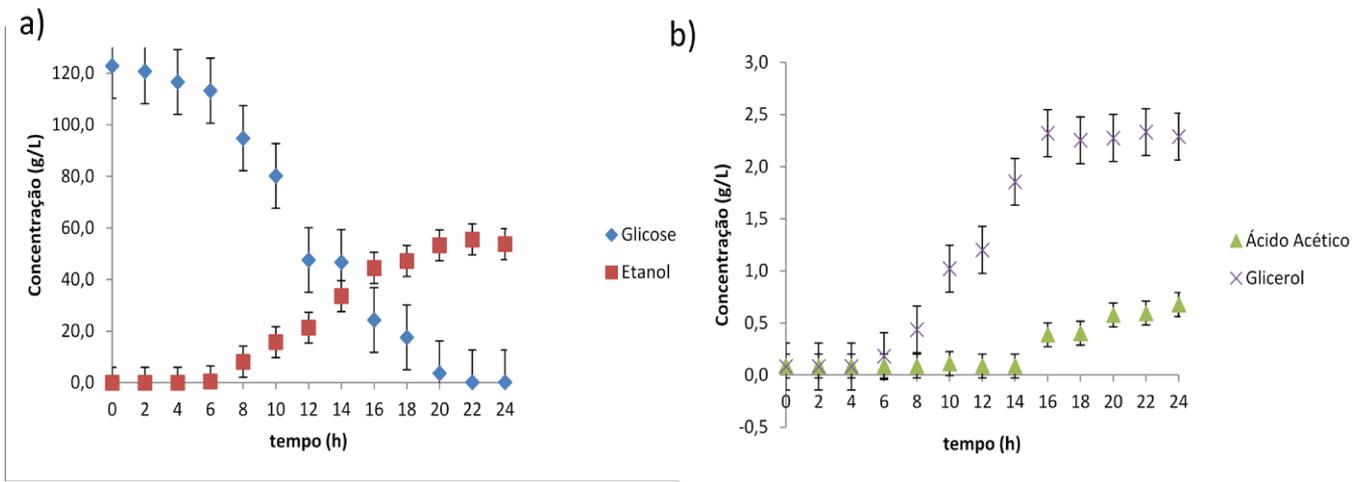


Figura 30: Concentração de glicose, etanol (a), ácido acético e glicerol (b) ao longo do tempo nos ensaios de fermentação em batelada.

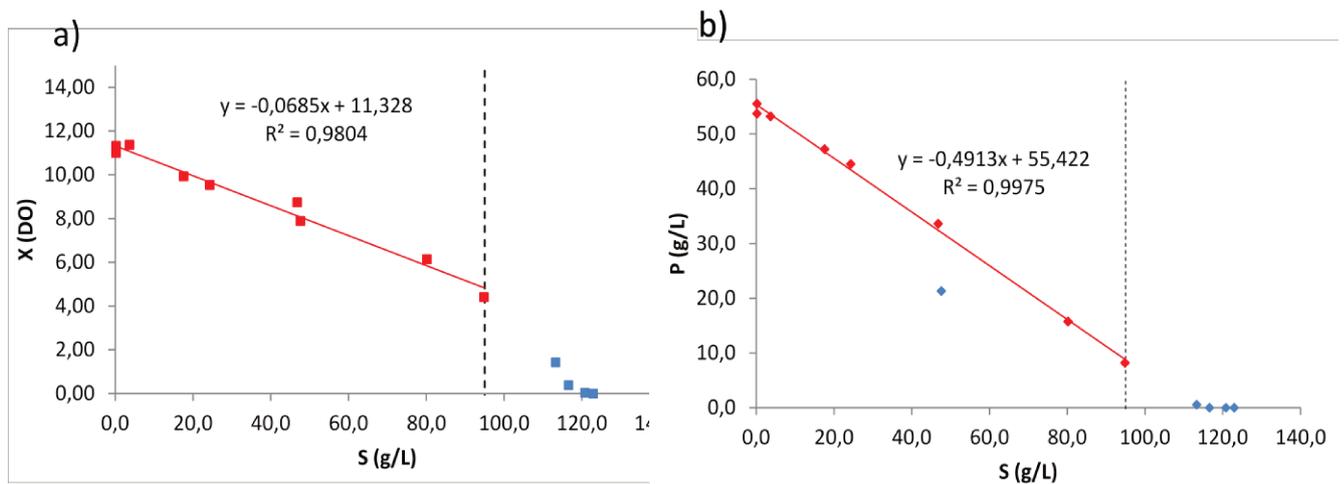


Figura 31: Relação entre a) concentração de biomassa e concentração de substrato e b) concentração de produto e concentração de substrato. Destacados em vermelho, a região após a fase de latência e respectivo ajuste linear.

Por fim, considerando que o substrato é completamente consumido em 20h de reação, calcula-se a produtividade da reação de fermentação (Q_E) como:

$$Q_E = \frac{C_E(20h) - C_E(0h)}{20 - 0} = \frac{53,3 - 0}{20 - 0} = 2,66 \text{ g/hL}$$

Onde:

- Q_E – produtividade de etanol, em g/hL;
- C_E – concentração de etanol, em g/L.

5.5.2 Produção de ABE

As fermentações em batelada foram realizadas em triplicata e em escala bancada, em frascos com volumes de operação de 50 mL, seguindo o protocolo explicitado anteriormente. Foram utilizados dois meios de cultura distintos, uma utilizando Licor C₅ (caso 01) e outra utilizando Licor C₆ + C₅ (caso 02).

Para o caso 01, o licor apresentava um aspecto muito escuro, interferindo na leitura de densidade óptica (Figura 32). Apesar de haver uma produção de ABE (Figura 33), não é possível observar um padrão lógico no crescimento celular.

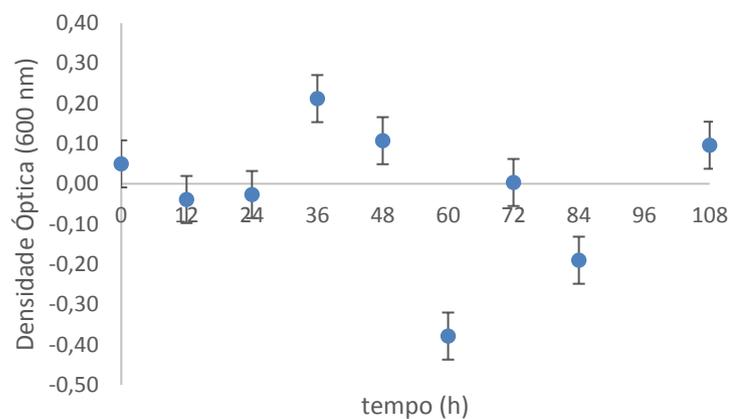


Figura 32: Crescimento celular médio dos ensaios de fermentação em batelada – Caso 01.

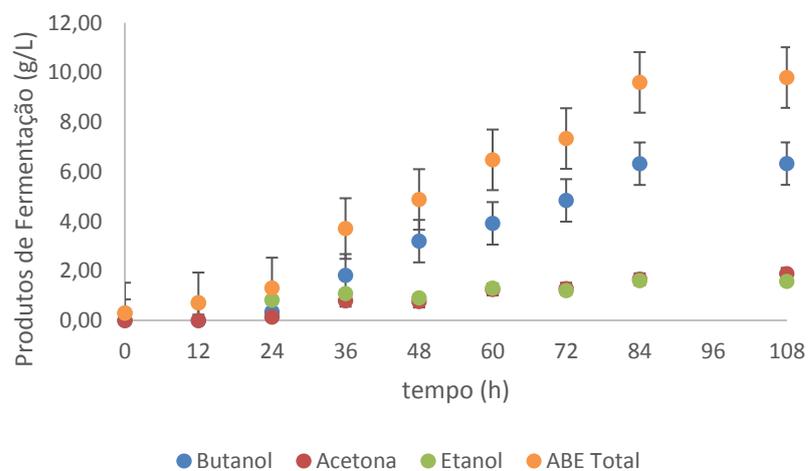


Figura 33: Concentração de n-butanol, acetona, etanol e ABE total durante a fermentação – Caso 01.

Observa-se que a metabolização da xilose é lenta, sendo que a estabilização da fermentação ocorre após 84h de operação. A concentração de n-butanol ultrapassa o valor de 5 g/L após 72h de fermentação. Na Figura 34 observa-se a variação do pH da reação, sendo clara a presença das fases acidogênica (até 24h) e solvetogênica (após 24h), que caracterizam a fermentação ABE (Gottumukkala et al. 2017). A diminuição do pH nas primeiras 24h é justificada pela produção de ácido acético e butírico neste mesmo período (Figura 35).

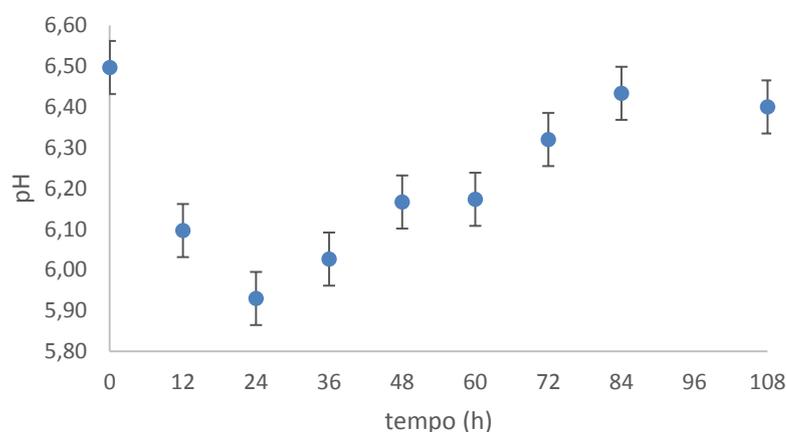


Figura 34: Variação do pH do meio reacional no decorrer da fermentação - Caso 01



Figura 35: Concentração de ácido acético e ácido butírico no decorrer da fermentação – Caso 01

A concentração de açúcares redutores totais foi monitorada pelo método colorimétrico DNS (Anexo IX), mas apenas os valores final e inicial foram medidos em cromatografia. Assumindo que a reação durara 84h, a concentração média de xilose

caiu de 60 g/L para 33,5 g/L, refletindo em uma conversão de apenas 43% do substrato. Calcula-se o rendimento e produtividade para cada uma das substâncias de interesse, apresentada na Tabela 20.

Tabela 20: Concentração final, produtividade e rendimento dos solventes obtidos na fermentação ABE - Caso 01

Produtos	Concentração (g/L)	Produtividade (g/Lh)	Rendimento (g/g)
Acetona	1,89	0,022	0,071
Butanol	6,33	0,075	0,239
Etanol	1,28	0,015	0,048
ABE	9,49	0,113	0,359

Já para o caso 02, foi possível medir a densidade óptica e observar um comportamento real, sem valores negativos. O crescimento ocorre até a 36^a hora de fermentação, seguida por um declínio. Esta queda ocorre devido à transição da bactéria de sua forma vegetativa (que permanece em suspensão) para sua forma de esporos (que decanta e, portanto, não é coletada a amostragem).

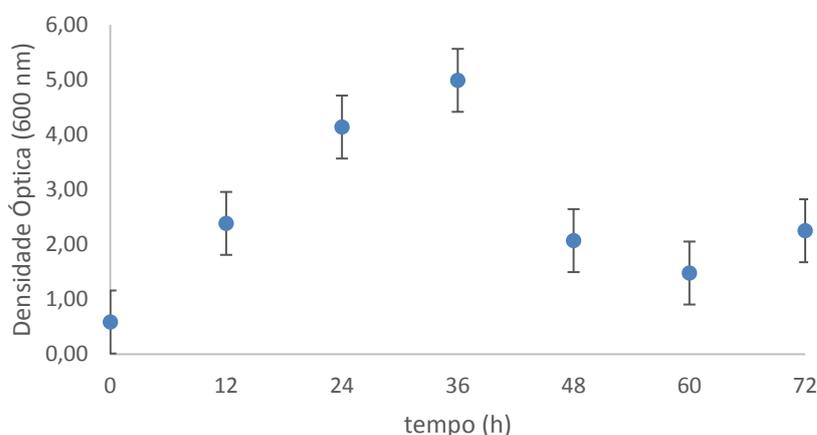


Figura 36: Crescimento celular médio dos ensaios de fermentação em batelada – Caso 02.

Já para o caso 02, foi possível medir a densidade óptica e observar um comportamento real, sem valores negativos. O crescimento ocorre até a 36^a hora de fermentação, seguida por um declínio. Esta queda ocorre devido à transição da bactéria de sua forma vegetativa (que permanece em suspensão) para sua forma de

esporos (que decanta e, portanto, não é coletada na amostragem). Na Figura 37, é apresentado o perfil do pH durante a fermentação, que mais uma vez acompanha a produção e consumo dos intermediários ácido acético e ácido butírico Figura 38.

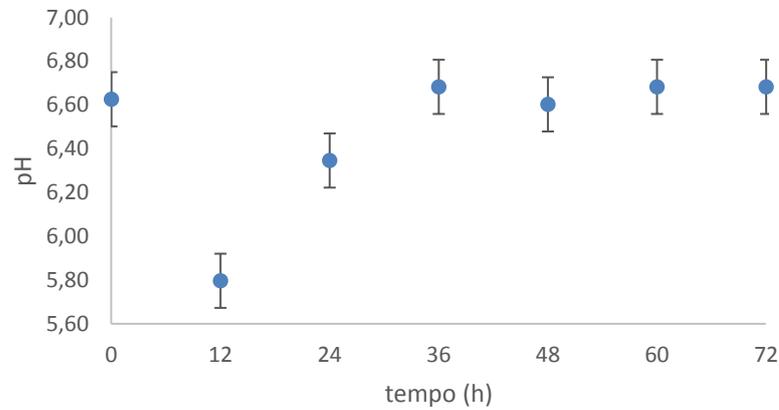


Figura 37: Variação do pH do meio reacional no decorrer da fermentação - Caso 02

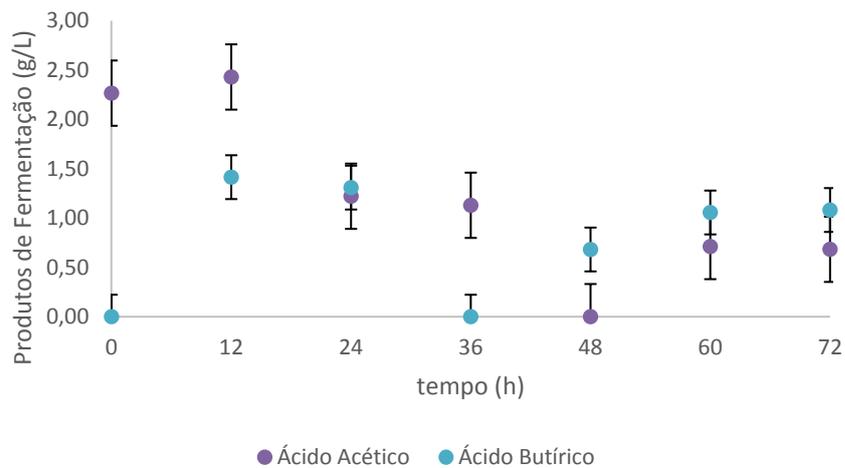


Figura 38: Concentração de ácido acético e ácido butírico no decorrer da fermentação – Caso 02

Por fim, apresenta-se o perfil de produção dos solventes de interesse na Figura 39. Observa-se que a produção de n-butanol é máxima (9,31 g/L) após 72h de fermentação e que seu valor supera 5 g/L em algum momento entre 12h e 24h. A concentração média de glicose cai de 42,2 para 14,1 g/L e a concentração de xilose diminui de 17,8 g/L para 9,9 g/L. As conversões de glicose foram, respectivamente, 67% e 45%.

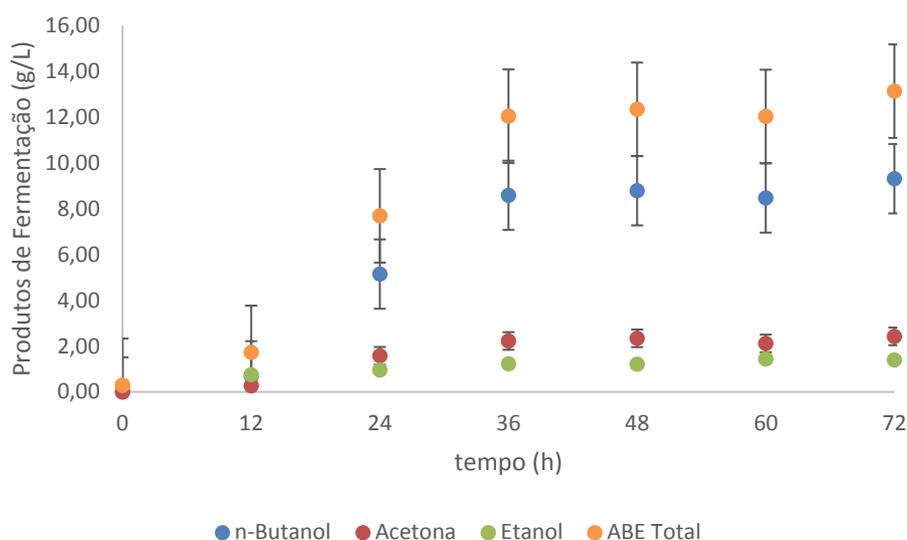


Figura 39: Concentração de n-butanol, acetona, etanol e ABE total durante a fermentação – Caso 02.

Por fim, apresenta-se o perfil de produção dos solventes de interesse na Figura 39. Observa-se que a produção de n-butanol é máxima (9,31 g/L) após 72h de fermentação e que seu valor supera 5 g/L em algum momento entre 12h e 24h. A concentração média de glicose cai de 42,2 para 14,1 g/L e a concentração de xilose diminui de 17,8 g/L para 9,9 g/L. As conversões de glicose foram, respectivamente, 67% e 45%.

Tabela 21: Concentração final, produtividade e rendimento dos solventes obtidos na fermentação ABE - Caso 01

Produtos	Concentração (g/L)	Produtividade (g/Lh)	Rendimento (g/g)
Acetona	2,43	0,034	0,067
Butanol	9,31	0,129	0,257
Etanol	1,11	0,015	0,031
ABE	12,84	0,178	0,355

A luz dos dados apresentados, algumas conclusões podem ser feitas. O substrato xilose apenas (caso 20) apresentou conversão similar em ambas as fermentações (43% e 45%), mostrando que a bactéria não é capaz de metabolizar toda a xilose. Xiao e colaboradores (Xiao et al. 2012) mostram que *Clostridium*

beijerinckii NCIMB8052 apresentam conversões similares (cerca de 50%) quando cultivada em meio sintético.

As concentrações de n-butanol e ABE totais obtidas experimentalmente (6,33 g/L de n-butanol e 9,49 de ABE) também são similares aos valores reportados na literatura (7,51 g/L de n-butanol e 9,01 de ABE). A produtividade, no entanto, foi muito inferior do que o reportado pela literatura. Enquanto Xiao e colaboradores reportam produtividades de ABE de 0,3 g/L.h, com a estabilização do produto em aproximadamente após 72h de reação, experimentalmente foram obtidos produtividades de 0,113 g/L.h após 84h de reação. A lenta taxa de produção deve-se ao elevado teor de ácido acético no início das fermentações, que leva a longas fases de latência.

Já com relação às produtividades de ABE a partir do licor composto por glicose e xilose (caso 02 – $Q_{nB} = 0,129$ g/L.h, $Q_{ABE} = 0,178$ g/L.h), seus valores são maiores do que as do caso anterior, mas ainda sim inferiores aos valores a valores reportados por Mariano e colaboradores, de 0,24 g/L.h (Mariano, Qureshi, et al. 2012). Esta diferença pode ser justificada por dois motivos principais: Mariano e colaboradores utilizaram meio sintético e a fonte de substrato era apenas glicose. Nos experimentos conduzidos, há a presença de inibidores e o substrato é glicose e xilose na proporção de aproximadamente 2,33. Os rendimentos e conversões obtidos são similares aos reportados na literatura.

Por fim, o fato da concentração de n-butanol alcançar 5 g/L após 72h no caso 01, julga-se que a tecnologia de extração a vácuo do produto durante a fermentação não se justifica para fermentações ABE que ocorram em Licor C₅ apenas. Uma estratégia de remoção de inibidores (como o ácido acético) se faz necessária neste caso. Já para o caso 02, decide-se que o vácuo será aplicado após 20h de fermentação, quando a concentração de n-butanol é superior a 20 g/L.

5.6 Fermentação batelada com aplicação de vácuo intermitente

5.6.1 Produção de Etanol

A fim de se aumentar a produtividade de etanol e diminuir efeitos inibitórios que o produto causa sobre a atividade metabólica do microrganismo, avalia-se a aplicação de vácuo intermitente. Utiliza-se o mesmo aparato experimental descrito na Figura 25 e, a luz dos dados obtidos nas seções 5.6 e 5.5 deste capítulo, opta-se pela aplicação do vácuo conforme ilustrado Figura 40. Os ensaios foram realizados em triplicata.

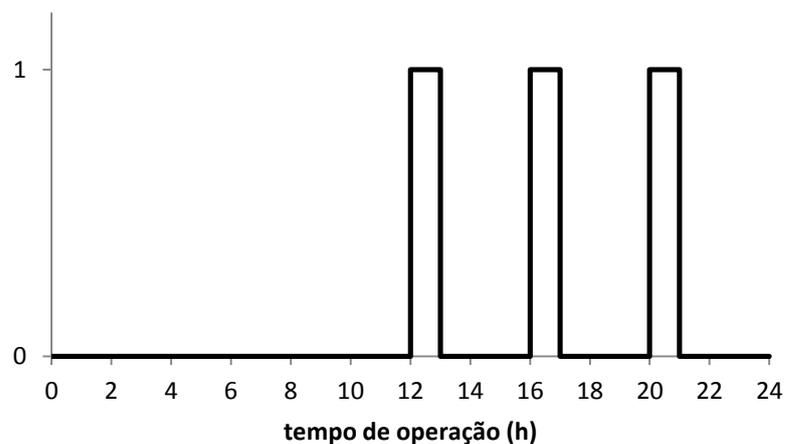


Figura 40: Diagrama de operação da bomba de extração de produto a vácuo, onde o valor "0" corresponde a desligado e "1" corresponde a ligado.

Apresenta-se, na Figura 41, o crescimento celular medido por densidade óptica em espectrofotômetro em função do tempo de operação. Apesar de estatisticamente os valores de densidade óptica das populações obtidas nos ensaios batelada e batelada com vácuo permanecerem serem iguais, a medida por densidade óptica não se mostra tão confiável, pois, durante os experimentos, observou-se grande quantidade de sólidos aderidos na parede interna do reator. Medição de concentração celular utilizando-se o método de massa seca também não é indicado devido à presença de sólidos. Sondas de medição on-line podem ser eficientes. De fato, no tempo 12h, a densidade óptica celular do ensaio batelada ($7,9 \pm 0,2$) é

estatisticamente maior que a densidade óptica celular no ensaio batelada com aplicação de vácuo ($6,1 \pm 1,0$).

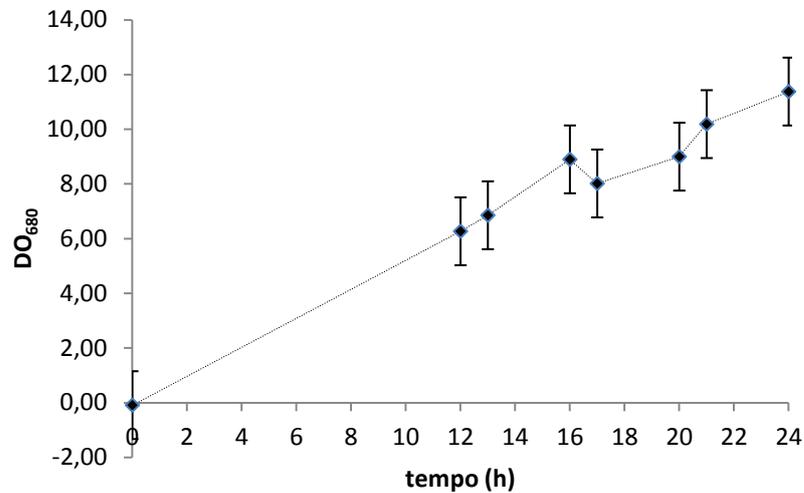


Figura 41: Crescimento celular da operação do fermentador com aplicação de vácuo.

Na Figura 42 são apresentados os perfis temporais de glicose, etanol, glicerol e ácido acético nos ensaios de fermentação com aplicação de vácuo intermitente. Notória é a diminuição do tempo de consumo total do substrato que, de 20h cai para 17h com esta operação. Observa-se claramente, também, a diminuição na concentração de etanol durante as aplicações de vácuo. Observa-se que o segundo vácuo é o que extrai mais produto devido a dois motivos: (1) a concentração de etanol é maior, o que implica em uma fase vapor mais rica em etanol se comparada com o primeiro vácuo, conforme ilustrado no diagrama da Figura 43 e (2) a produção de etanol é menor, pois a concentração de glicose é inferior, desacelerando a cinética de produção de etanol.

Apresenta-se, na Tabela 22 a concentração de glicose e etanol para os tempos inicial e final do reator, balão e armadilha. Estas informações serão utilizadas para os cálculos dos parâmetros de fermentação, descritos a seguir:

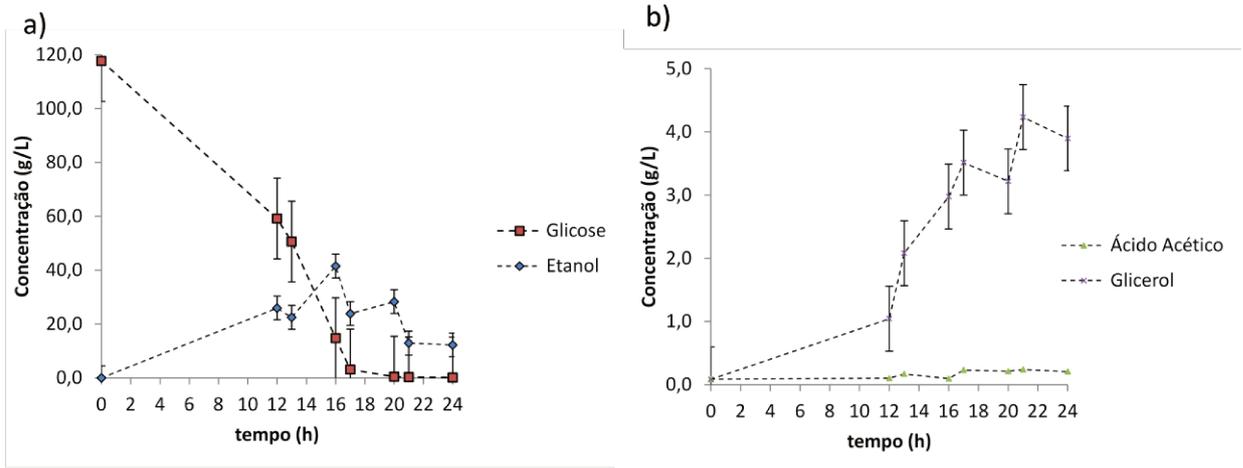


Figura 42: Concentração de glicose, etanol (a), ácido acético e glicerol (b) ao longo do tempo nos ensaios de fermentação em batelada com aplicação de vácuo intermitente.

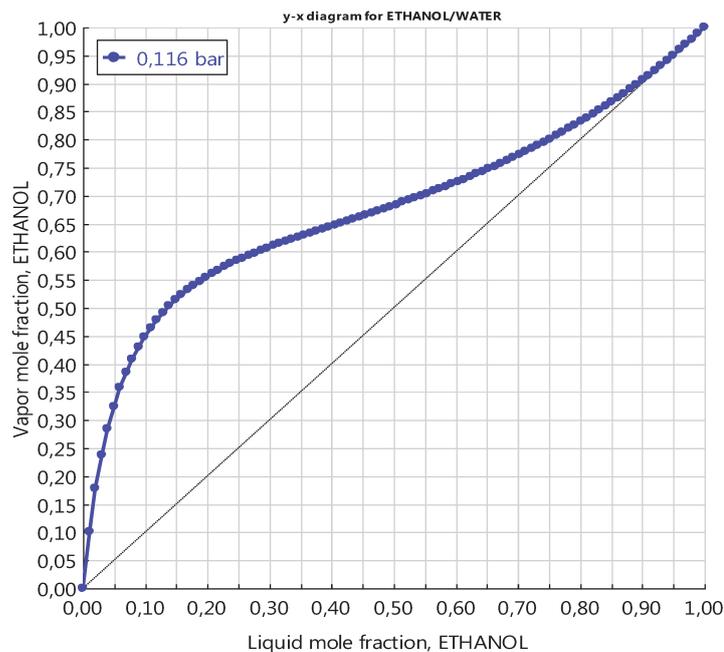
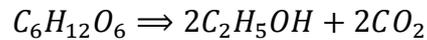


Figura 43: Diagrama de equilíbrio de fases para a mistura binária etanol-água a pressão constante 0,116 bar, gerado pelo software Aspen Plus 8.6, utilizando o modelo de coeficiente de atividade NRTL e a equação de estado RK.

Apresenta-se, na Tabela 22 a concentração de glicose e etanol para os tempos inicial e final do reator, balão e armadilha. Estas informações serão utilizadas para os cálculos dos parâmetros de fermentação, descritos a seguir. Os parâmetros para cada experimento são apresentados na Tabela 23.

- Etanol teórico máximo (ETM): Considerando a estequiometria da reação de fermentação na qual não há produção de outros produtos além de etanol e nem de crescimento de biomassa celular, calcula-se o ETM, em g.



$$180 \Rightarrow 2 \times 46 + 2 \times 44$$

$$\frac{ETM}{m_{glicose}} = \frac{ETM}{V_{Reator} \times C_{glicose}} = \frac{2 \times 46}{180} = 0,51$$

- Etanol Obtido (m_{etanol}): soma-se o produto entre volume (L) e concentração de etanol (g/L), para o reator, balão e armadilha no tempo final. O resultado obtido apresenta unidades em gramas.

- Rendimento (η): razão entre massa de etanol obtido e massa de glicose final. Expresso em gramas de etanol dividido por gramas de glicose.

- Rendimento relativo (η_r): razão entre rendimento e o rendimento máximo teórico (0,51 g etanol/g glicose).

- Produtividade de etanol (Q_E): massa de etanol obtida dividido pelo volume inicial do reator e pelo tempo de consumo de substrato.

- Concentração da fase vapor (C_{EV}): razão entre a soma das massas de etanol no balão e armadilha no tempo final (em g) e volume do balão (em L).

- Fração mássica de etanol na fase vapor (y_E) e na fase líquida (x_E): razão entre massa do componente e massa da mistura no balão e reator, respectivamente.

- Seletividade (S):
$$S = \frac{\frac{y_E}{1-y_E}}{\frac{x_E}{1-x_E}}$$

- Extratibilidade (Ext): razão entre a soma das massas de etanol no balão e na armadilha, em g, volume inicial do reator, em L, e tempo de aplicação de vácuo ao longo do experimento, em h.

Tabela 22: Caracterização volume, composição e massa de produto no reator, balão e armadilha nos tempos inicial e final de fermentação

Ensaio 01				
	Volume (mL)	C _{Glicose} (g/L)	C _{Etanol} (g/L)	m _{Etanol} (g)
Reator t ₀	2000	111,9	0,0	0,0
Reator t ₂₄	1496	0,2	5,6	8,4
Balão	504	0,0	181,0	91,2
Armadilha	500	0,0	22,9	11,5
Ensaio 02				
	Volume (mL)	C _{Glicose} (g/L)	C _{Etanol} (g/L)	m _{Etanol} (g)
Reator t ₀	2000	120,5	0,0	0,0
Reator t ₂₄	1680	0,2	19,7	33,1
Balão	320	0,0	213,8	68,4
Armadilha	490	0,0	27,7	13,6
Ensaio 03				
	Volume (mL)	C _{Glicose} (g/L)	C _{Etanol} (g/L)	m _{Etanol} (g)
Reator t ₀	2200	120,6	0,0	0,0
Reator t ₂₄	1700	0,2	11,5	19,5
Balão	500	0,0	187,1	93,6
Armadilha	515	0,0	31,5	16,2

Tabela 23: Parâmetros de fermentação obtidos nos ensaios de fermentação batelada com aplicação de vácuo.

Ensaio	1	2	3	Média
ETM (g)	114,1	122,9	135,3	124,1
m _{Etanol} (g)	111,4	115,1	129,3	118,6
η (g/g)	0,498	0,478	0,487	0,488
η _R	97,6%	93,7%	95,5%	95,6%
tempo (h)	17	20	17	18
Q _E (g/L.h)	3,28	2,88	3,46	3,20
C _{EV} (g/L)	203,7	256,2	219,6	226,5
y _E	20,37%	25,62%	21,96%	22,65%
x _E	0,37%	1,17%	0,67%	0,74%
S	68,3	29,0	41,5	46,3
Ext (g/hL)	17,2	13,7	16,6	15,8

A aplicação de vácuo resulta em ganhos importantes no processo fermentativo. Além da já observada diminuição de tempo de fermentação, a produtividade média aumentou de 2,66 g/L.h para 3,20 g/L.h e o rendimento médio aumentou de 0,44 g/g

para 0,49 g/g de etanol. O aumento na produtividade aumentou devido ao aumento do rendimento e diminuição do tempo de fermentação.

Além disso, a aplicação de vácuo resulta na obtenção de um produto mais concentrado se comparado com a concentração dos ensaios batelada (226,2 g/L comparado com 56,2 g/L). Os dispêndios com vapor de certo seriam minimizados na etapa de purificação, mas o teor de etanol no caldo de fermentação após a operação com vácuo (vinho) não pode ser desprezado. Possivelmente, uma extensão da duração do vácuo nesta etapa seria necessária para obter-se mais produto.

Observa-se também que os valores de produto obtidos na armadilha são elevados. Sugere-se como trabalho futuro o desenvolvimento de um sistema de condensação de produto adequado a este processo.

5.6.2 Produção de ABE

Analogamente, avalia-se o efeito da extração de produtos de fermentação por aplicação de vácuo intermitente. Utiliza-se o mesmo aparato experimental descrito na Figura 27 e, a luz dos dados obtidos nas seções 5.6 e 5.5 deste capítulo, opta-se pela aplicação do vácuo conforme ilustrado Figura 44. Os ensaios foram realizados em triplicata.

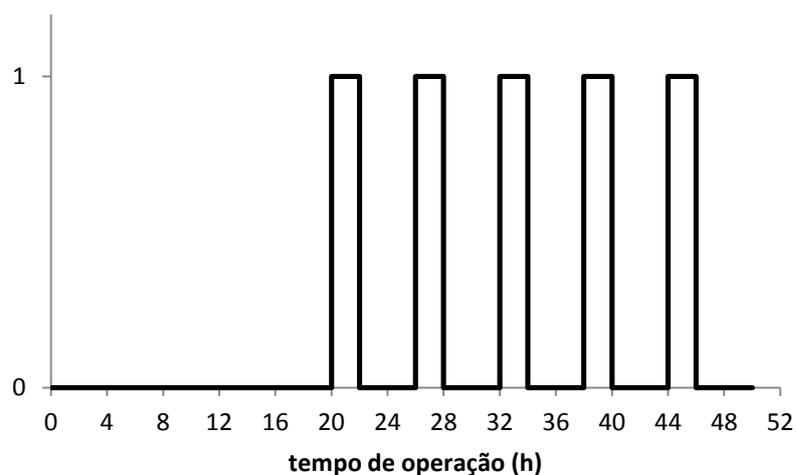


Figura 44: Diagrama de operação da bomba de extração de produto a vácuo, onde o valor "0" corresponde a desligado e "1" corresponde a ligado.

Apresenta-se, na Figura 45, o crescimento celular medido por densidade óptica em espectrofotômetro em função do tempo de operação. O comportamento observado difere das fermentações bateladas. Enquanto na fermentação batelada há uma diminuição da densidade óptica em função da esporulação do microrganismo, no caso da fermentação com vácuo, os valores de densidade óptica permaneceram sempre elevados. Pode ser que a extração do produto (e conseqüente diminuição da hostilidade do meio) aliada à presença de xilose residual não levem o microrganismo a esporular no tempo avaliado. Ou ainda, o borbulhamento causado pela evaporação pode levar a resuspensão dos esporos.

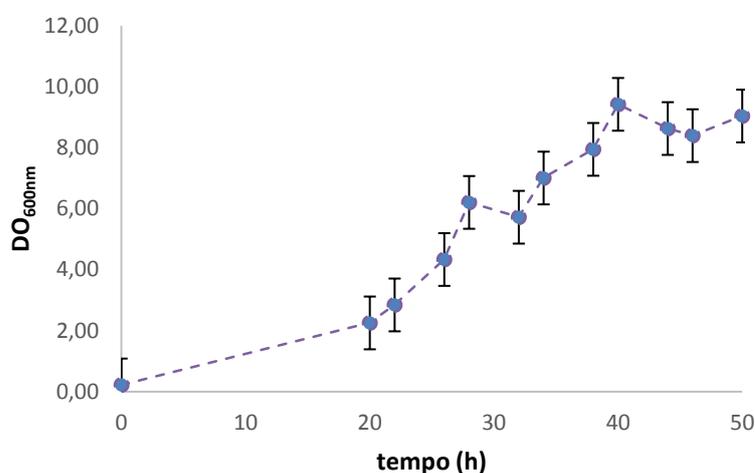


Figura 45: Crescimento celular da operação do fermentador com aplicação de vácuo.

A variação de pH ao longo do tempo também diferiu do observado nos ensaios batelada, conforme apresentado na Figura 46. Com exceção da primeira seção de vácuo, o meio tende a ter o pH durante as sessões de vácuo. O ácido acético não apresenta um padrão de comportamento durante as seções de vácuo, enquanto o ácido butírico, por possuir uma volatilidade baixa, é praticamente constante, conforme ilustrado na Figura 47.

Outro ganho que a fermentação a vácuo apresentou foi a conversão de substrato. A concentração média de glicose caiu de 40,7 g/L para 0,0 g/L (conversão de 100%), enquanto a de xilose caiu de 14,6 g/L para 7,3 g/L (conversão de 50%).

Enquanto o ganho na conversão de xilose foi discreto (aproximadamente 6%), é notório o ganho no consumo de glicose.

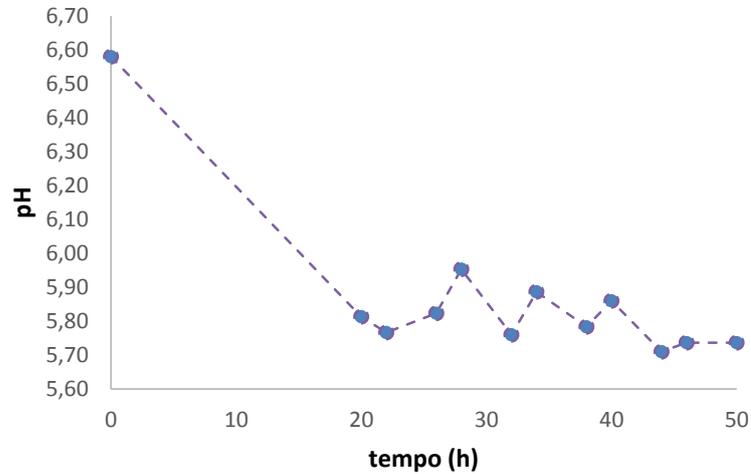


Figura 46: Crescimento celular da operação do fermentador com aplicação de vácuo.

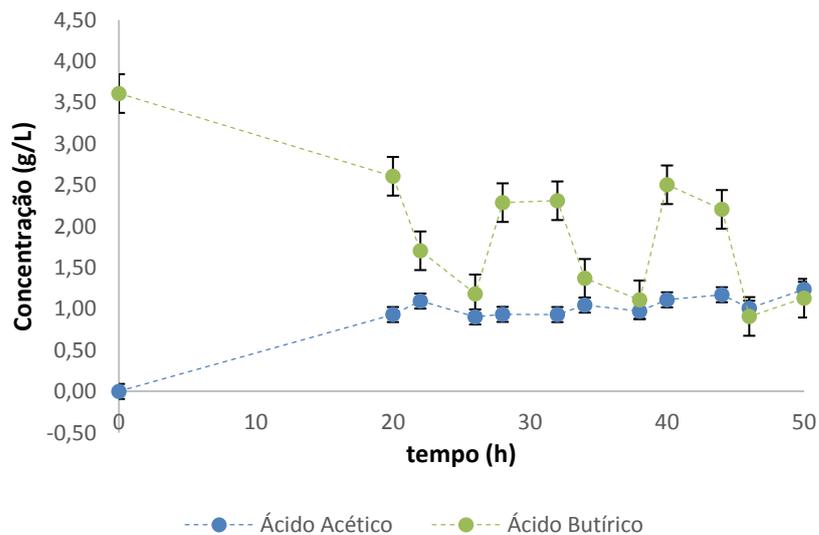


Figura 47: Concentração de ácido acético e ácido butírico no decorrer da fermentação com aplicação de vácuo intermitente.

Por fim, apresentam-se os perfis de concentração dos solventes produzidos durante os ensaios de fermentação na Figura 48. Observa-se que a produção de solventes ocorreu mais lentamente em biorreatores se comparada com o caso batelada, pois a concentração de ABE ainda era 2,5 g/L após 20h de operação. Diferentemente da fermentação de etanol, o metabolismo do micorganismo

permaneceu ativo durante as 50h, pois observou uma produção sempre acentuada de ABE nos intervalos entre vácuo.

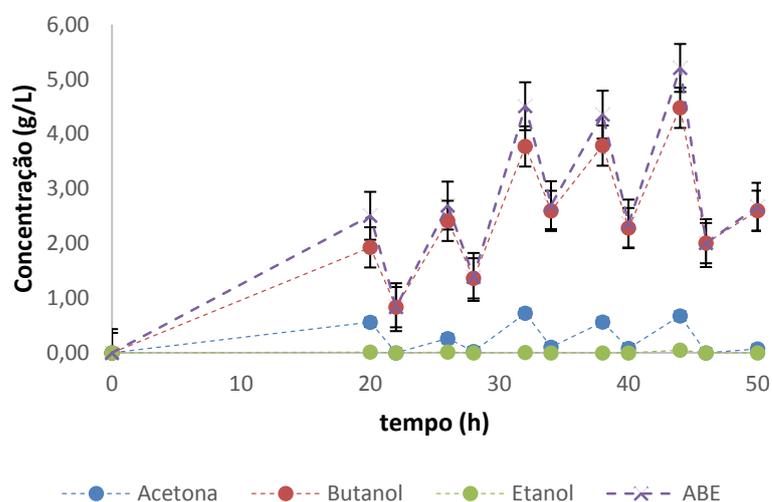


Figura 48: Concentração de n-butanol, acetona, etanol e ABE total durante a fermentação com aplicação de vácuo intermitente.

Apresenta-se, na Tabela 24 a concentração de glicose, xilose, acetona, butanol e etanol para os tempos inicial e final do reator, balão e armadilha. Estas informações serão utilizadas para os cálculos dos parâmetros de fermentação apresentados na seção 5.6.1. Os parâmetros para cada experimento são apresentados na Tabela 25.

Uma vez mais, a aplicação de vácuo impactou positivamente e negativamente o processo fermentativo. Como primeiro ganho, foi o já mencionado aumento da conversão de glicose, tendo um maior aproveitamento do substrato. Um segundo parâmetro que apresenta ganhos foi a produtividade, que aumentou de 0,178 para 0,248 g de ABE/L.h. Este aumento de 39% é de extrema importância para o processo e deverá trazer redução no número de equipamentos necessários para fermentar todo o substrato em escala industrial. O rendimento de produção de ABE diminuiu de 0,354 g/g para 0,300 g/g, mas especificamente o rendimento de n-butanol permaneceu o mesmo (0,257 g/g para ambas as fermentações). Por fim, a concentração do produto final aumentou de 12,8 g/L para 76,0 g/L de ABE total e 9,3 g/L para 63,5 g/L de n-butanol. Este aumento de 492% certamente haverá

implicações na demanda de vapor necessária para que ocorra a purificação do produto.

Tabela 24: Caracterização volume, composição e massa de produto no reator, balão e armadilha nos tempos inicial e final de fermentação.

Ensaio 01						
	Volume (mL)	C. Glicose (g/L)	C. Xilose (g/L)	C. Acetona (g/L)	C. Butanol (g/L)	C. Etanol (g/L)
Reator t_0	2000	36,08	14,71	0,00	0,00	0,00
Reator						
t_50	1715	0,00	10,68	0,00	2,14	0,00
Balão	285	0,00	0,00	2,65	72,67	1,96
Trap	860	0,00	0,00	0,32	3,72	0,00
Ensaio 02						
	Volume (mL)	C. Glicose (g/L)	C. Xilose (g/L)	C. Acetona (g/L)	C. Butanol (g/L)	C. Etanol (g/L)
Reator t_0	2000	41,07	14,43	0,00	0,00	0,00
Reator						
t_24	1695	0,00	11,29	0,00	1,79	0,00
Balão	305	0,00	0,00	8,24	49,36	1,29
Trap	910	0,00	0,00	1,05	1,75	0,00
Ensaio 03						
	Volume (mL)	C. Glicose (g/L)	C. Xilose (g/L)	C. Acetona (g/L)	C. Butanol (g/L)	C. Etanol (g/L)
Reator t_0	2000	45,15	14,70	0,00	0,00	0,00
Reator						
t_24	1600	0,00	0,00	0,22	3,87	0,00
Balão	400	0,00	0,00	9,12	44,43	1,06
Trap	970	0,00	0,00	3,78	3,16	0,00

5.7 Fermentação etanólica semi-batelada com aplicação de vácuo intermitente

A fim de se aumentar a produtividade de etanol e diminuir efeitos inibitórios que o produto causa sobre a atividade metabólica do microrganismo, avalia-se a aplicação de vácuo intermitente e regime semi-batelada. Nesta etapa extra ao escopo do trabalho, deseja-se testar a hipótese de que a redução de volume de trabalho aumentaria a produtividade de etanol em um regime estendido.

Após uma seção de vácuo, a concentração celular aumenta, refletindo em um aumento da taxa de metabolização dos açúcares. A reposição de substrato poderia implicar em sua metabolização veloz. Além disso, a reposição de meio implica em

poder estender a produção de etanol por tempos superiores a batelada, implicando em um aumento de produtividade, pois se busca manter a produção de etanol pelo metabolismo celular sempre ativo de elevado.

Tabela 25: Parâmetros de fermentação obtidos nos ensaios de fermentação batelada com aplicação de vácuo.

	Acetona	Butanol	Etanol	ABE
Ensaio 01				
Rendimentos (g/g)	0,012	0,331	0,007	0,350
Produtividade (g/Lh)	0,010	0,276	0,006	0,292
Concentração do Produto (g/L)	3,62	83,88	1,96	89,46
Fração Mássica Balão	0,36%	8,39%	0,20%	8,95%
Fração Mássica Reator	0,00%	0,12%	0,00%	0,12%
Seletividade	∞	73,3	∞	78,7
Extratibilidade (g/h.L)	0,06	1,61	0,03	1,70
Ensaio 02				
Rendimentos (g/g)	0,038	0,214	0,004	0,256
Produtividade (g/Lh)	0,035	0,197	0,004	0,235
Concentração do Produto (g/L)	11,38	54,57	1,29	67,23
Fração Mássica Balão	1,14%	5,46%	0,13%	6,72%
Fração Mássica Reator	0,00%	0,11%	0,00%	0,11%
Seletividade	∞	54,6	∞	68,2
Extratibilidade (g/h.L)	0,20	1,16	0,02	1,39
Ensaio 03				
Rendimentos (g/g)	0,064	0,226	0,004	0,293
Produtividade (g/Lh)	0,077	0,270	0,004	0,351
Concentração do Produto (g/L)	18,30	52,10	1,06	71,46
Fração Mássica Balão	1,83%	5,21%	0,11%	7,15%
Fração Mássica Reator	0,01%	0,24%	0,00%	0,26%
Seletividade	135,54	22,7	∞	30,0
Extratibilidade (g/h.L)	0,48	1,69	0,03	2,07
Média				
Rendimentos (g/g)	0,038	0,257	0,005	0,300
Produtividade (g/Lh)	0,041	0,248	0,005	0,293
Concentração do Produto (g/L)	11,10	63,52	1,44	76,05
Fração Mássica Balão	1,11%	6,35%	0,14%	7,61%
Fração Mássica Reator	0,00%	0,16%	0,00%	0,16%
Seletividade	135,54	50,2	∞	59,0
Extratibilidade (g/h.L)	0,25	1,49	0,03	1,72

Nesta etapa extra ao escopo do trabalho, busca-se validar a hipótese de que o regime pode operar de modo quase contínuo e apresentar uma produtividade ainda

maior que o caso batelada com aplicação de vácuo, pois se busca manter a produção de etanol pelo metabolismo celular sempre ativo de elevado.

Utiliza-se o mesmo aparato experimental descrito na Figura 25 e, a luz dos dados obtidos nas seções 5.6 e 5.5 deste capítulo, opta-se pela aplicação do vácuo conforme ilustrado. Os ensaios serão realizados em triplicata, mas até o momento do exame de qualificação, dispõe-se de uma duplicata. A alimentação de hidrolisado de eucalipto suplementado se dá por auxílio de uma bomba peristáltica, previamente calibrada, e é efetuado até que o nível de 2L seja repostado, observando-se a gradação do próprio reator.

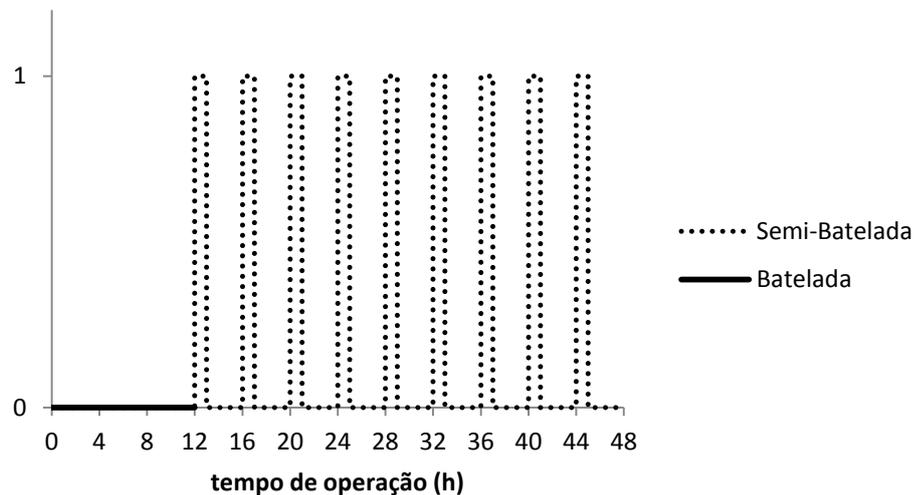


Figura 49: Diagrama de operação da bomba de extração de produto a vácuo, onde o valor "0" corresponde a desligado e "1" corresponde a ligado.

Na Figura 50, é apresentado o crescimento celular da primeira replicata de experimentos. Observa-se um valor inferior comparado à batelada realizada em erlenmeyer, devido a adesão de sólidos na parede do reator. Observa-se, também, que a concentração final de células (17,5) é superior comparado aos outros ensaios, provavelmente devido ao extenso tempo de operação.

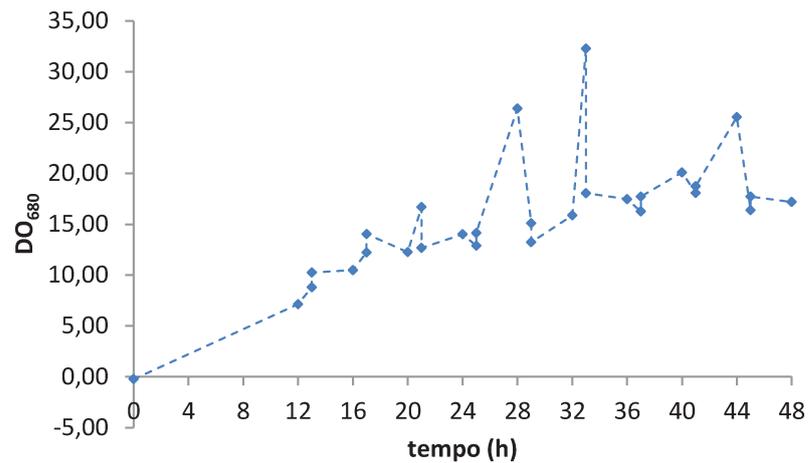


Figura 50: Crescimento celular da operação do fermentador com aplicação de vácuo. Disponível apenas da primeira replicata.

Na Figura 51 são apresentados os perfis temporais de glicose, etanol, glicerol e ácido acético nos ensaios de fermentação com aplicação de vácuo intermitente. Verifica-se que a reposição de meio não fornece substrato suficiente para manter a concentração de glicose em uma concentração estatisticamente superior a zero, a ponto de manter a produção de etanol ativa durante as 3h de intervalo entre a extração com vácuo..

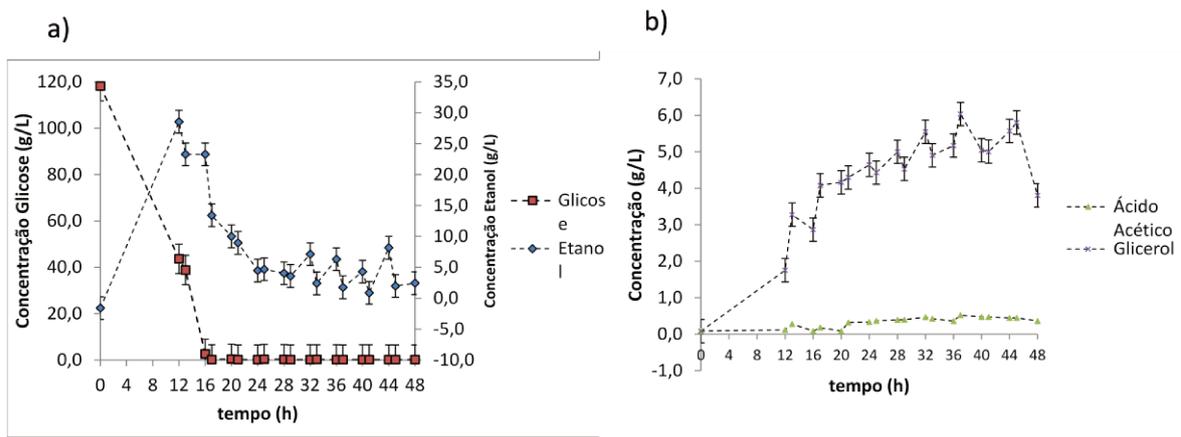


Figura 51: Concentração de glicose, etanol (a), ácido acético e glicerol (b) ao longo do tempo nos ensaios de fermentação em semi-batelada com aplicação de vácuo intermitente.

Apresenta-se, na Tabela 26 a concentração de glicose e etanol para os tempos inicial e final do reator, balão, armadilha e alimentação. Estas informações serão

utilizadas para os cálculos dos parâmetros de fermentação, descritos na seção 5.6.1 deste capítulo. Os parâmetros para cada experimento são apresentados na Tabela 27.

Os resultados obtidos mostram uma piora com relação ao regime batelada e aplicação de vácuo em três parâmetros: rendimento, produtividade e concentração de etanol. A inesperada diminuição no rendimento pode ser justificada por 2 motivos. Primeiramente, por haver nove aplicações de vácuo, e não três ou uma, as perdas de etanol pode ser significativas. Apesar do ensaio de extração ter mostrado poucas perdas, durante a operação, ao acionar a bomba, frequentemente sentia-se um odor de etanol forte. Outra possibilidade é que a operação por praticamente 24h com valores de substrato muito baixos podem ter levado a levedura utilizar o próprio etanol como substrato.

Tabela 26: Caracterização volume, composição e massa de produto no reator, balão e armadilha nos tempos inicial e final de fermentação.

Ensaio 01				
	Volume (mL)	C _{Glicose} (g/L)	C _{Etanol} (g/L)	m _{Etanol} (g)
Reator t ₀	2000	123,1	0,0	0,0
Alimentação	1450	123,1	0	0
Reator t ₂₄	1900	0,2	3,5	6,6
Balão	1430		106,2	151,8
Armadilha	524		48,8	25,6
Ensaio 02				
	Volume (mL)	C _{Glicose} (g/L)	C _{Etanol} (g/L)	m _{Etanol} (g)
Reator t ₀	2400	113,3	0,0	0,0
Alimentação	1535	113,3	0	0
Reator t ₂₄	1650	0,2	5,4	9,0
Balão	1675		98,2	164,4
Armadilha	520		51,7	26,9
Ensaio 03				
	Volume (mL)	C _{Glicose} (g/L)	C _{Etanol} (g/L)	m _{Etanol} (g)
Reator t ₀	---	---	---	---
Alimentação	---	---	---	---
Reator t ₂₄	---	---	---	---
Balão	---	---	---	---
Armadilha	---	---	---	---

Tabela 27: Parâmetros de fermentação obtidos nos ensaios de fermentação batelada com aplicação de vácuo.

Ensaio	1	2	3	Média
ETM (g)	216,6	227,4	---	222,0
m_{Etanol} (g)	184,0	200,3	---	192,1
η (g/g)	0,433	0,449	---	0,441
η_R	85,0%	88,1%	---	86,5%
tempo (h)	48	48	---	48
Q_E (g/L.h)	1,92	1,74	---	1,83
C_{EV} (g/L)	124,1	114,2	---	119,1
y_E	12,41%	11,42%	---	11,91%
x_E	0,18%	0,33%	---	0,26%
S	77,6	39,0	---	58,3
Ext (g/hL)	13,6	13,8	---	13,7

A diminuição da produtividade deve-se ao fato de que o tempo de operação foi estendido significativamente, mas devido ao baixo teor de substrato, a produção de etanol ao final de cada ciclo de 1h de vácuo + 3h semibatelada/batelada era não foi suficiente para elevar ou quiçá manter os valores de produtividade.

Por fim, a diminuição da concentração de etanol evaporado também é devida a baixa produção do mesmo. Havendo pouco na fase líquida, evapora-se principalmente água. A temperatura de ebulição da água pura a 0,116 bar 48 °C. Portanto, mesmo se não houvesse etanol presente, água entraria em ebulição e condensaria, diluindo o produto. Talvez, um estudo de escolha da melhor pressão de operação se faz necessário junto a tentativa de manter a concentração de substrato suficientemente elevada.

Possíveis estratégias para manutenção da concentração de substrato elevada:

- Alimentar substrato mais concentrado, estando ciente de que acarretaria no aumento do consumo de vapor industrial, invalidando o benefício trazido pela aplicação de vácuo.
- Antes de alimentar meio, fazer uma "sangria" do reator, removendo uma parcela de líquido, de modo a diluir menos o substrato quando alimentado.

- Reduzir o intervalo sem aplicação de vácuo.

5.8 Flexibilização do processo de fermentação

Após obter todos os parâmetros industriais de interesse, parte-se para a pergunta central desta dissertação: a flexibilização da produção de etanol e ABE a partir de uma unidade Kraft. Os pontos de integração são vários: tratamento de águas residuais, unidade catalítica de combustão de efluentes gasosos, caldeiras, sistema de distribuição de vapor, turbinas, sistema de água de resfriamento, outras utilidade, parte do sistema de purificação do produto, etc. Especificamente para este trabalho, serão avaliados dois pontos de flexibilização do processo: número de fermentadores e sistema de vácuo.

Para tanto, será considerado o processo ilustrado na Figura 6 (Capítulo 2), no qual o licor rico em pentoses é direcionado exclusivamente para fermentação ABE, enquanto o licor rico em hexoses pode ser direcionado para a produção de etanol ou ABE, segundo condições de mercado. Segundo estudos do nosso grupo de pesquisa (Pereira et al. 2017), a rentabilidade econômica máxima se dá quando em dois casos: no primeiro, o licor rico em hexoses é completamente enviado para a produção de etanol. No segundo, todos os dois licores são enviados para a produção de ABE, não havendo produção de etanol neste caso. Esta etapa do trabalho possui dois objetivos principais:

Objetivo 01: estimar o número de reatores necessários para uma planta flexível, observando qual dos dois regimes de operação citados acima dita o número de fermentadores.

Objetivo 02: verificar o impacto que a utilização da tecnologia de extração a vácuo tem no número de fermentadores, bem como avaliar a necessidade de condensadores.

Para o estudo a seguir, foram adotados os parâmetros "concentração inicial de açúcares", "conversão", "rendimento" e "produtividade" dos casos de fermentação batelada e fermentação em batelada com vácuo. Também se assumiu a mesma razão

obtida de produção entre massa de eucalipto e licores, mencionados no Capítulo 04. Foram assumidas hipóteses apresentadas na Tabela 28 e que o processo possui evaporadores para fornecer o hidrolisado com as concentrações utilizadas experimentalmente. Os casos estudados são apresentados na Tabela 29.

Tabela 28: Hipóteses adotadas no cálculo do número de reatores necessários no processamento do hidrolisado.

Parâmetro	Valor adotado
Vazão de eucalipto destinado a produção de solventes	300.000 t/ano
Tempo de operação industrial	330 dias/ano
Eficiência industrial	85%
Headspace do fermentador	40%
Volume de trabalho do fermentador	675 m ³
Tempo Carregamento do fermentador	2,0 h
Tempo de Limpeza do Reator	2,0 h
Tempo Descarga do fermentador	2,0 h

Tabela 29: Condições operacionais dos casos para os quais serão estimados o número de reatores

Caso	1.A	1.B	2.A	2.B
Produção de Etanol				
Produção de ABE				
Aplicação de vácuo na produção de Etanol				
Aplicação de vácuo na produção de ABE				

O primeiro parâmetro calculado é a vazão de hidrolisado produzido. Apresenta-se o memorial de cálculo para o Caso 01

$$\dot{V}_h = \frac{\dot{V}_E \cdot r_{H/E}}{t_{OP} \cdot \eta_I} \frac{1}{24}$$

Onde:

- \dot{V}_h é a vazão de hidrolisado produzido, em m³/h;
- \dot{V}_E é a vazão de eucalipto alimentado, em t/ano;
- $r_{H/E}$ é a razão entre hidrolisado e eucalipto, em m³/t;

- t_{op} é o tempo de operação da unidade, em dias/ano;
- η_i é a eficiência industrial, em dias úteis/dias totais
- 1/24 é o fator de conversão entre dia e horas.

As produções de Licor C5 e Licor C6 são, respectivamente:

$$\dot{V}_{hC5} = \frac{300.000 \times 3}{330 \times 0.85} \times \frac{1}{24} = 133,7 m^3/h$$

$$\dot{V}_{hC6} = \frac{300.000 \times 4,5}{330 \times 0.85} \times \frac{1}{24} = 200,5 m^3/h$$

Com a vazão de hidrolisados, calcula-se o número de fermentadores necessários para processá-los:

$$n_R = \frac{\dot{V}_h \cdot Y_{P/S} \cdot (C_G^i \cdot X_G + C_X^i \cdot X_X)}{V_R \cdot Q_E}$$

Onde:

- n_R é o número de reatores, sempre arredondado para cima;
- \dot{V}_h é a vazão de hidrolisado produzido, em m³/h;
- $Y_{P/S}$ é o rendimento do processo, em g/g;
- C_G^i e C_X^i são as concentrações iniciais de glicose e xilose em g/L;
- X_G e X_X são as conversões de glicose e xilose em g/g;
- V_R é o volume de um reator;
- Q_E é a produtividade corrigida em g/L.h, que considera não apenas o tempo de reação, mas também o tempo de carga, descarga e limpeza do fermentador.

Para o caso 01, tem-se que todo o hidrolisado é direcionado para a produção de ABE. Desta forma, o número de reatores requeridos é:

$$n_R = \frac{334,2 \times 0,355 \cdot (46,2 \times 0,67 + 13,8 \times 0,45)}{675 \times 0,183} = 33$$

A rotina de cálculo descrita foi aplicada para os quatro casos mencionados e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 30. Observa-se que, para ambos os casos (1 e 2), a limitação se dá pelo processo de produção de ABE. Ou seja, os casos 1.A e 2.A são os que ditam o número de reatores necessário para cada operação. Outra observação foi que, apesar da tecnologia a vácuo promover melhorias nos parâmetros industriais da produção de etanol, para esses volumes e vazão, estas melhorias não se traduzem de uma redução significativa de número do número de reatores (de 8 para 7). Por fim, o uso da tecnologia a vácuo nas fermentações ABE reduzem o número de fermentadores requeridos de 36 para 28 tanques, que deve se traduzir em significativo ganho em CAPEX, apesar de 28 ainda ser um número elevado industrialmente.

Tabela 30: Número de reatores para os casos avaliados

Caso	1.A	1.B	2.A	2.B
# Reatores - Etanol	0	8	0	7
# Reatores - ABE	36	18	28	18
# Reatores - Total	36	24	28	24

Para avaliar a necessidade de condensadores e bombas de vácuo, esboça-se o diagrama de ocupação da operação dos 28 reatores do caso 2.A, apresentado na Figura 52. Ao olhar qualquer coluna do diagrama, verifica-se que sempre existirão 5 operações de vácuo simultâneas. Sendo assim, para atender a demanda de fermentação, ao invés de 28 sistemas de vácuo e condensação, seriam necessários apenas 5, que trabalhariam alternando o fermentador.

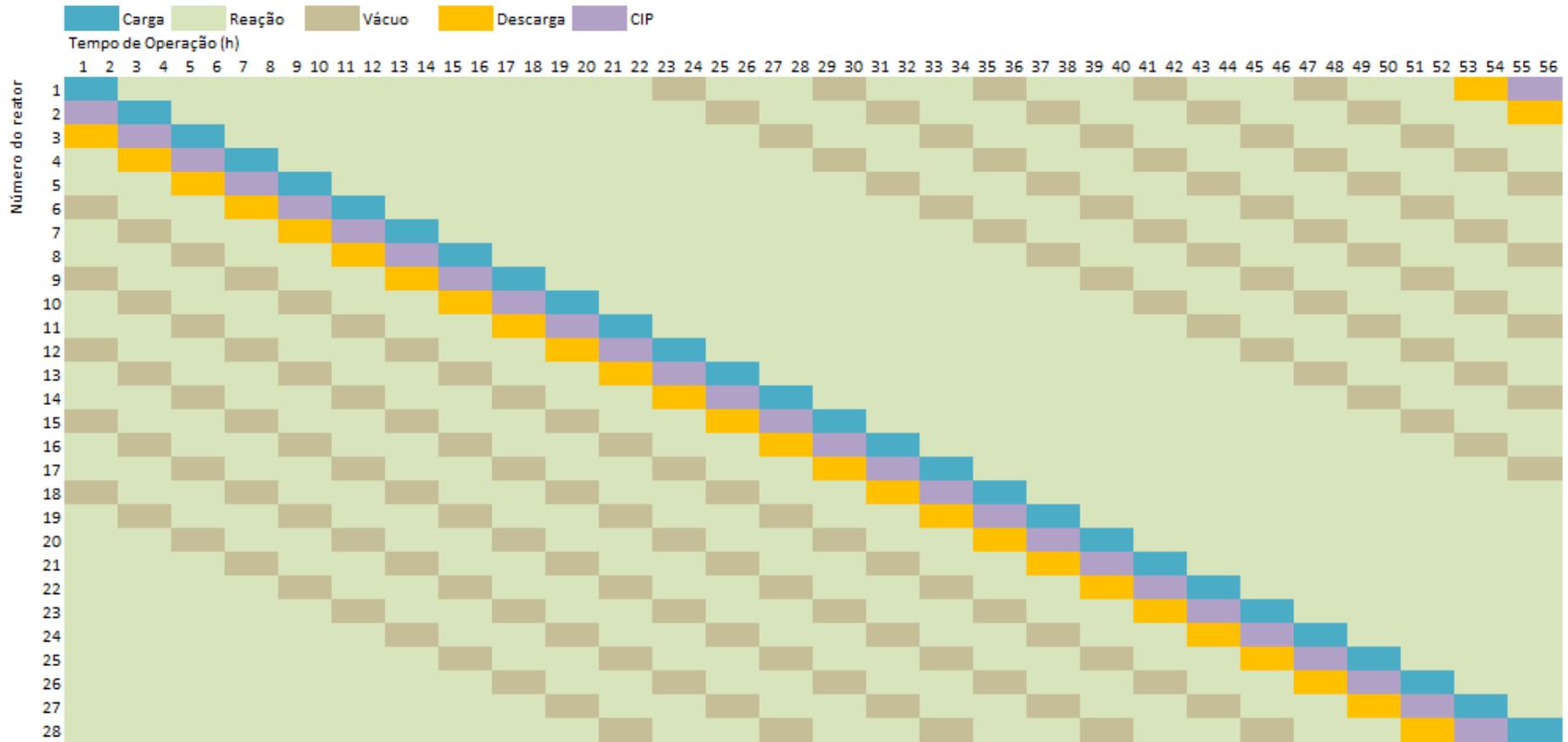


Figura 52: Diagrama de ocupação para o caso da operação para a Fermentação do caso 2.A (caso limitante para operação com vácuo)

5.9 Considerações finais

Em conclusão aos estudos de fermentação, pode-se observar que a tecnologia de extração a vácuo traz ganhos reais para um processo industrial flexível de produção entre etanol e ABE.

Primeiramente, os parâmetros de processos fermentativos apresentaram melhorias significativas, com exceção do rendimento na fermentação ABE. O uso da tecnologia a vácuo reduziu o número de fermentadores necessários, apesar do número total requerido ainda ser grande.

Uma operação semi-batelada pode ser interessante para este tipo de operação, desde que o fornecimento de substrato após cada seção de vácuo seja suficiente para manter o metabolismo do microrganismo ativo durante o período de intervalo de vácuo. Caso contrário, indicadores de desempenho inferiores à operação batelada seriam obtidos, similar ao observado experimentalmente.

Capítulo 06 – Considerações Finais

6.1 Conclusões

Com este trabalho, estudou-se a flexibilização da produção de etanol e ABE a partir de cavacos de eucalipto, compreendendo-se quais são os principais ganhos que a integração das operações unitárias e dos produtos trás ao processo. No Capítulo 01, foram apresentados os objetivos, os quais foram respondidos com o desenvolvimento deste trabalho.

A revisão bibliográfica do Capítulo 02 não só conferiu a base para os procedimentos e ideias deste trabalho, mas também para expor que a produção flexível de ABE e etanol a partir de cavacos de eucalipto não é bem explorada pela literatura. De fato, a parcela do grupo de pesquisa que trabalha com simulação e avaliação econômica do processo industrial carece de informações.

No capítulo 03 mostrou-se a caracterização dos cavacos de eucalipto, coquetéis enzimáticos e microrganismos. Como ponto principal, observou-se que o eucalipto é uma biomassa recalcitrante, conforme indicado pelas análises de difração de raios-x. Informação foi corroborada com a dificuldade em hidrolisá-lo a seus açúcares monoméricos constituintes.

No capítulo 04, observou-se que pré-tratamento com ácido diluído e com hidróxido de sódio mostraram pouco eficazes em tornar esta biomassa acessível a enzimas, resultando em concentrações próximas a 6 g/L de glicose. Estudos mostram que outros pré-tratamentos como explosão a vapor e líquido iônico são apostas mais promissoras. Em paralelo a este trabalho (resultados não mostrados aqui), o peróxido de hidrogênio tem se mostrado um interessante agente de pré-tratamento, no entanto tem como ponto negativo a degradação da lignina.

Por fim, no capítulo 05, conduziu-se todo o estudo de fermentação e análise de integração dos processos. O hidrolisado de eucalipto suplementado não provoca inibição da atividade microbiana da *Saccharomyces cerevisiae*, fazendo do eucalipto uma biomassa com potencial para produção de etanol. No entanto, o licor obtido a partir do pré-tratamento com ácido sulfúrico, rico em pentoses possui elevados teores de ácido acético (> 6,0 g/L), inibindo a ação do *Clostridium beijerinckii*.

Os ganhos trazidos pelo uso da tecnologia a vácuo são importantes para a fermentação ABE. Além da melhoria dos parâmetros industriais, o número de reatores necessários diminuiu de 36 para 28 tanques. Além disso, observando o diagrama de ocupação traçado, não é necessário que o número de sistemas de extração do produto seja equivalente ao de fermentadores. De fato, apenas 5 sistemas são requeridos.

Encerra-se este trabalho com duas mensagens principais. A primeira é de que o pré-tratamento ácido e alcalino nas condições testadas não são os mais indicados para o cavaco de eucalipto. São necessários mais estudos para que a obtenção de concentrações de carboidratos no substrato que sejam práticas e comuns na indústria. A segunda conclusão deste capítulo é de que a aplicação de vácuo em fermentações batelada traz, de fato, ganhos de projeto e processo. É necessário um estudo mais aprofundado do regime semi-batelada, que poderá resultar em um aumento ainda maior na produtividade do processo.

6.2 Sugestões de trabalhos futuros

No desenvolvimento deste trabalho, foram identificadas oportunidades de trabalhos futuros enunciadas a seguir:

- Utilizar pré-tratamentos combinados de ácido sulfúrico e explosão a vapor, ao invés de apenas ácido sulfúrico. A elevada severidade da explosão a vapor pode trazer melhores rendimentos de processo.
- Estudar o aproveitamento da lignina de eucalipto produzida com o pré-tratamento ácido. O alto teor de lignina nos cavacos de eucalipto e seu potencial

como matéria prima para a produção de diversos produtos pode tornar o portfólio de produtos ainda mais flexível.

- Avaliar a fermentação com reciclo de células, de modo a se aproximar ainda mais da realidade industrial de fermentação brasileira e reduzir custos de operação.

- Tendo em vista que o condensador utilizado nos ensaios de fermentação com vácuo não são suficientes, desenvolver um sistema de condensação que seja mais eficiente, não requerendo a operação de absorção a posteriori.

- Uma vez que houve dificuldade na medição de densidade óptica, desenvolver um "softsensor" ou utilizar alguma ferramenta de controle avançado, como redes neurais, para prever a concentração celular ao longo do tempo.

- Avaliar o regime semi-batelada com aplicação de vácuo intermitente para a produção de ABE. Para o caso do Etanol, alterar os tempos de aplicação de vácuo e de repouso, de modo aumentar a produtividade ainda mais, e estender a operação por um período maior que uma batelada.

Referências Bibliográficas

- A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, A. & Templeton, D., 2008. Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005 - 42619.pdf. *Technical Report NREL/TP-510-42619*, (January), pp.1–9. Available at: <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42619.pdf>.
- Agbor, V.B. et al., 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), pp.675–685. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>.
- Alvira, P. et al., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), pp.4851–4861. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>.
- Andrade, R.R. de, 2012. *MODELAGEM CINÉTICA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR CONCENTRADO COM MELAÇO CONSIDERANDO RECICLO DE CÉLULAS*. Universidade Estadual de Campinas.
- ANP, 2016. *Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis*, Rio de Janeiro: Ministério de Minas e Energia.
- ANP, 2017. Produção de Etanol. Available at: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/dados-estatisticos> [Accessed February 1, 2017].
- Atsumi, S. & Liao, J.C., 2008. Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(5), pp.414–419.
- Bailey, M.J., Biely, P. & Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23(3), pp.257–270.
- van den Berg, C. et al., 2013. Simultaneous clostridial fermentation, lipase-catalyzed esterification, and ester extraction to enrich diesel with butyl butyrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(1), pp.137–142.
- Beta_Renewables, 2013. Press Release: Crescentino's Biorefinery Grand Opening. 1, p.1. Available at: <http://www.betarenewables.com/en/media-relations/press-release-detail/1?locale=en> [Accessed January 25, 2017].
- Bezerra, R.M.F. & Dias, A.A., 2005. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis: Inhibition by ethanol and cellobiose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 126(1), pp.49–59.
- Bidlack, J., Malone, M. & Benson, R., 1992. Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 72, pp.51–56.
- BiofuelsDigest, 2014. 10 Biggest Bioeconomy Blockbuster stories of 2014. Available at: <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/12/22/10-biggest-bioeconomy-blockbuster-stories-of-2014-americas/> [Accessed December 1, 2016].

- BiofuelsDigest, 2016. Renewable specialty chemicals: The Digest's 2016 Multi-Slide Guide to Green Biologic. Available at: <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2016/12/13/renewable-specialty-chemicals-the-digests-2016-multi-slide-guide-to-green-biologics/6/>.
- Carvalho, D.M. de et al., 2015. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. *Industrial Crops and Products*, 73, pp.118–126. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.021>.
- Chandra, R.P. et al., 2007. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108(May), pp.67–93.
- Chaturvedi, V. & Verma, P., 2013. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. 3 *Biotech*, 3(5), pp.415–431. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-013-0167-8>.
- Cherchi, F. et al., 2011. on Biochemical Platform. , pp.291–327.
- Chiarello, L.M. et al., 2016. Production of cellulosic ethanol from steam - exploded Eucalyptus urograndis and sugarcane bagasse at high total solids and low enzyme loadings. *Sustainable Chemical Processes*, pp.1–9.
- Chum, H.L. et al., 1990. Pretreatment-Catalyst effects and the combined severity parameter. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24–25(1), pp.1–14.
- Correia, J.A. da C. et al., 2013. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. *Bioresource Technology*, 139, pp.249–256. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.153>.
- Le Couteur, P. & Burreson, J., 2006. *Os Botões de Napoleão* 1st ed., Rio de Janeiro: Editora Zahar.
- Dias, M.O.S. et al., 2013. Cogeneration in integrated first and second generation ethanol from sugarcane. *Chemical Engineering Research and Design*, 91(8), pp.1411–1417. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2013.05.009>.
- Ezeji, T.C., Qureshi, N. & Blaschek, H.P., 2003. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(6), pp.595–603.
- Galbe, M. & Zacchi, G., 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108(July), pp.41–65.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), pp.257–268. Available at: <http://www.iupac.org/publications/pac/1987/pdf/5902x0257.pdf%5Cnhttp://www.degruyter.com/view/j/pac.1987.59.issue-2/pac198759020257/pac198759020257.xml>.

- Goldemberg, J. & Guardabassi, P., 2009. The potential for first generation ethanol production from sugarcane. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), pp.246–256.
- Gottumukkala, L.D., Haigh, K. & Görgens, J., 2017. Trends and advances in conversion of lignocellulosic biomass to biobutanol : Microbes , bioprocesses and industrial viability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76(February), pp.963–973. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.030>.
- Gouveia, E.R. et al., 2009. Validación de metodología para caracterización química de bagazo de cana-de-azúcar. *Química Nova*, 32(6), pp.1500–1503.
- Green, E.M., 2011. Fermentative production of butanol-the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), pp.337–343.
- Hames, B. et al., 2008. Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 8 / 06 / 2008 Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP). *National Renewable Energy Laboratory*, (August), pp.1–9.
- Henry, R.J., Cannon, D.C. & Winkelman, J.W., 1974. *Clinical chemistry principles and techniques* 2nd ed., New York: Harper and Row Publishers.
- Hitt, M.A. et al., 2002. *Administração estratégica*,
- Hobsbawm, E.J., 1962. *A Era das Revoluções*, Rio de Janeiro: Paz e Terra.
- Hsu, T.-C. et al., 2010. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, 101(13), pp.4907–4913. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.009>.
- Huang, H., Singh, V. & Qureshi, N., 2015. Butanol production from food waste: a novel process for producing sustainable energy and reducing environmental pollution. *Biotechnology for biofuels*, 8, p.147. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4572674&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- IBÁ, 2015. - Indústria brasileira de Árvores. *Anuario estatístico da IBA: ano base 2014. 2015*, p.100.
- IEA, 2014. *IEA Bioenergy: Task42 Biorefining*, Available at: http://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2014/09/IEA-Bioenergy-Task42-Biorefining-Brochure-SEP2014_LR.pdf.
- Inoue, H. et al., 2008. Combining hot-compressed water and ball milling pretreatments to improve the efficiency of the enzymatic hydrolysis of eucalyptus. *Biotechnology for biofuels*, 1, p.2.
- Kaam, B. & Gruber, P.R., 2006. *Biorefineries - Industrial Processes and Products*, Weinheim: Wiley-VCH.
- Kalia, S. & Kaith, B.S., 2009. Synthesis of flax-g-copolymers under pressure for use in phenolic composites as reinforcement. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 54(2),

pp.108–112.

Kelman, J., 2008. *Atlas de Energia Elétrica do Brasil* 3rd ed., Brasilia.

Kujawska, A. et al., 2015. ABE fermentation products recovery methods - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 48, pp.648–661. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.028>.

Kumar, P. et al., 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(8), pp.3713–3729.

Lima, M.A. et al., 2013. Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production - part 1. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), p.75. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3667114&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Liu, C.G. et al., 2014. Assessment and regression analysis on instant catapult steam explosion pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, 166, pp.368–372. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.069>.

Lopes, E.S., 2015. *CINÉTICA, ESTUDO E AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE DESLIGNIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO COM ÁCIDO SULFÚRICO DILUÍDO*. University of Campinas.

M&G_Chemicals, 2017. M&G Chemicals Key technologies. , p.1. Available at: <http://www.mg-chemicals.com/en/business/key-technologies> [Accessed January 31, 2017].

Maeda, R.N. et al., 2011. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*, 46(5), pp.1196–1201. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.022>.

Maiorella, B., Blanch, H.W. & Wilke, C.R., 1983. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(1), pp.103–121.

Mariano, A.P., Qureshi, N., et al., 2012. Assessment of in situ butanol recovery by vacuum during acetone butanol ethanol (ABE) fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(3), pp.334–340.

Mariano, A.P. et al., 2011. Bioproduction of butanol in bioreactors: New insights from simultaneous in situ butanol recovery to eliminate product toxicity. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8), pp.1757–1765.

Mariano, A.P., Filho, R.M. & Ezeji, T.C., 2012. Energy requirements during butanol production and in situ recovery by cyclic vacuum. *Renewable Energy*, 47, pp.183–187. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2012.04.041>.

Martin-Sampedro, R. et al., 2014. Enhancement of enzymatic saccharification of Eucalyptus

- globulus: Steam explosion versus steam treatment. *Bioresource Technology*, 167, pp.186–191. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.027>.
- Martin, C. et al., 2012. Enzyme loading dependence of cellulose hydrolysis of sugarcane bagasse. *Quimica Nova*, 35(10), pp.1927–1930.
- Merino, S.T. & Cherry, J., 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108(June), pp.95–120.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, p.426.
- MME, 2015. Resenha Energética Brasileira - Exercício de 2014. *Ministério de Minas e Energia*, pp.1–32. Available at: [http://www.mme.gov.br/documents/10584/3580498/02+-+Resenha+Energética+Brasileira+2016+-+Ano+Base+2015+\(PDF\)/66e011ce-f34b-419e-adf1-8a3853c95fd4;jsessionid=B415252F7145EC1BD6596B2C8137D1B8.srv155?version=1.0](http://www.mme.gov.br/documents/10584/3580498/02+-+Resenha+Energética+Brasileira+2016+-+Ano+Base+2015+(PDF)/66e011ce-f34b-419e-adf1-8a3853c95fd4;jsessionid=B415252F7145EC1BD6596B2C8137D1B8.srv155?version=1.0).
- Modenbach, A.A. & Nokes, S.E., 2012. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment-a review. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(6), pp.1430–1442.
- Mosier, N. et al., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), pp.673–686.
- Moulijn, J.A., Makkee, M. & van Diepen, A., 2003. *Chemical Process Technology*,
- Muñoz, C. et al., 2011. Bioethanol production from tension and opposite wood of Eucalyptus globulus using organosolv pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(11), pp.1861–1866.
- Mussatto, S.I. & Roberto, I.C., 2006. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(3), pp.268–274.
- Nelson, D. & Cox, M., 2011. *Lehninger Biochemie*,
- Nguyen, V.D. et al., 2011. Vacuum fermentation integrated with separation process for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 55(3), pp.208–214. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.05.001>.
- NREL, 2009. What is a Biorefinery. Available at: <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>.
- Oudshoorn, A., van der Wielen, L.A.M. & Straathof, A.J.J., 2009. Adsorption equilibria of bio-based butanol solutions using zeolite. *Biochemical Engineering Journal*, 48(1), pp.99–103.
- Papari, S. & Hawboldt, K., 2015. A review on the pyrolysis of woody biomass to bio-oil : Focus on kinetic models. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, pp.1580–

1595. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.191>.
- Park, S. et al., 2010. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for biofuels*, 3(1), p.10. Available at: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/10>.
- Pereira, B.L.C. et al., 2013. Influence of Chemical Composition of Eucalyptus Wood on Gravimetric Yield and Charcoal Properties. *BioResources*, 8(3), pp.4574–4592. Available at: http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_08_3_4574_Pereira_Eucalyptus_Gravimetric_Yield.
- Pereira, G.C.Q. et al., 2017. Development of a bioprocess with high energy efficiency for the flexible production of n-butanol/ethanol integrated to a kraft pulp mill. In *the 7th Nordic Wood Biorefinery Conference*. Estocolmo.
- Poutanen, K. & Puls, J., 1988. Characteristics of *Trichoderma reesei* p-xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28, pp.425–432.
- Qureshi, N. et al., 2010. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues : Part I – Use of barley straw hydrolysate 5. *Biomass and Bioenergy*, 34(4), pp.559–565. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.12.024>.
- Qureshi, N. & Blaschek, H.P., 2000. Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. *Renewable Energy*, 22(4), pp.557–564.
- Qureshi, N. & Ezeji, T.C., 2008. Butanol, “a superior biofuel” production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), pp.319–330.
- Reese, E.T., 1955. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Applied Microbiology*, 4(1), pp.39–45.
- Rehm, H.J. & Reed, G., 1983. *Biotechnology - Volume 3* H. Dellweg, ed., Weinheim: Verlag Chemie.
- Romaní, A., Garrote, G. & Parajó, J.C., 2012. Bioethanol production from autohydrolyzed *Eucalyptus globulus* by Simultaneous Saccharification and Fermentation operating at high solids loading. *Fuel*, 94, pp.305–312.
- Rosillo-Calle, F. & Cortez, L.A.B., 1998. Towards Proalcool II: a Review of the Brazilian Bioethanol Programme. , 14(2), pp.115–124.
- Rubin, E.M., 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), pp.841–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18704079>.
- Sluiter, A. et al., 2008. Determination of ash in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). *Nrel/Tp-510-42622*, (April 2005), p.18. Available at: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>.
- Sluiter, a et al., 2008. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, (March), p.9.

- Sluiter, a. et al., 2012. NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, (April 2008), p.17. Available at: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>.
- Sluiter, J., Nrel, a S. & Sluiter, a, 2011. Summative Mass Closure Laboratory Analytical Procedure (LAP) Review and Integration Issue Date : April 2010 Summative Mass Closure Laboratory Analytical Procedure (LAP) Review and Integration Revision Date : July 2011. *Nrel Lap*, 2011(July).
- Squina, F.M. et al., 2009. Xylan decomposition by *Aspergillus clavatus* endo-xylanase. *Protein Expression and Purification*, 68(1), pp.65–71.
- UNICA, 2012. Linha do tempo da cana de açúcar. *Rio de Janeiro*. Available at: <http://www.unica.com.br/linhadotempo/index.html> [Accessed December 1, 2016].
- ValorEconômico, 2016. Fibria planeja avançar em bioóleo. Available at: <http://www.valor.com.br/empresas/4667153/fibria-planeja-avancar-em-bio-oleo> [Accessed December 1, 2016].
- Wan, J., Wang, Y. & Xiao, Q., 2010. Effects of hemicellulose removal on cellulose fiber structure and recycling characteristics of eucalyptus pulp. *Bioresource Technology*, 101(12), pp.4577–4583. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.026>.
- Ward, O.P., 1991. *Biochemical Separations. Bioprocessing* 1st ed., New York: Van Nostrand Reinhold.
- Wei, W., Wu, S. & Liu, L., 2012. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated eucalyptus chips for fermentable sugar production. *Bioresource Technology*, 110, pp.302–307. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.003>.
- Wood, T.M. & Bhat, K.M., 1988. Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose. *Methods in Enzymology*, 160, pp.87–112. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687988601091>.
- Xiao, H. et al., 2012. Metabolic engineering of D -xylose pathway in *Clostridium beijerinckii* to optimize solvent production from xylose mother liquid. *Metabolic Engineering*, 14(5), pp.569–578. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2012.05.003>.
- Xu, J.K., Sun, Y.C. & Sun, R.C., 2015. Synergistic effects of ionic liquid plus alkaline pretreatments on eucalyptus: Lignin structure and cellulose hydrolysis. *Process Biochemistry*, 50(6), pp.955–965. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.03.014>.
- Yáñez-S, M. et al., 2013. Fuel ethanol production from Eucalyptus globulus wood by autocatalized organosolv pretreatment ethanol-water and SSF. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(1), pp.39–48.
- Yang, H. et al., 2012. Enhanced enzymatic hydrolysis of triploid poplar following stepwise acidic pretreatment and alkaline fractionation. *Process Biochemistry*, 47(4), pp.619–625. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.002>.
- Yao, Y. et al., 2013. Anaerobic digestion of poplar processing residues for methane

- production after alkaline treatment. *Bioresource Technology*, 134, pp.347–352. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.160>.
- Yeung, C. & Thomson, M.J., 2013. Experimental and kinetic modeling study of 1-hexanol combustion in an opposed-flow diffusion flame. *Proceedings of the Combustion Institute*, 34(1), pp.795–802. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.proci.2012.06.163>.
- Zhang, S. et al., 2012. Alkali combined extrusion pretreatment of corn stover to enhance enzyme saccharification. *Industrial Crops and Products*, 37(1), pp.352–357. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.001>.
- Zhang, Y., Han, B. & Ezeji, T.C., 2012. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. *New Biotechnology*, 29(3), pp.345–351. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2011.09.001>.
- Zheng, J. et al., 2015. Feasibility of acetone-butanol-ethanol fermentation from eucalyptus hydrolysate without nutrients supplementation. *Applied Energy*, 140, pp.113–119. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.11.037>.

Anexos

- I. Análise granulométrica
- II. Medição de Umidade
- III. Determinação de Extrativos
- IV. Determinação de Cinzas
- V. Hidrólise Ácida dos Sólidos
- VI. Determinação de Lignina Insolúvel
- VII. Determinação de Lignina Solúvel
- VIII. Determinação de Carboidratos Estruturais
- IX. Determinação de Atividade Enzimática – Celulases
- X. Determinação de Atividade Enzimática – β -Glicosidase
- XI. Determinação de Atividade Enzimática – Xilanase
- XII. Rendimento de Pré-Tratamento
- XIII. Determinação de Carboidratos Solúveis
- XIV. Hidrólise Ácida do Líquido

Anexo I – Análise Granulométrica

Para determinar-se a distribuição de tamanho de partícula e o seu diâmetro médio, utilizam-se peneiras da série de Taylor de 9, 10, 12, 14, 20, 24, 28, 32, 35, 48, 60, 65, 80, 115, 150, 200 e fundo. As peneiras foram previamente pesadas e empilhadas de modo que o menor mesh ficasse por cima. Foram colocados 80 g de biomassa aproximadamente a base vibratória foi acionada por 20 min. Após este período, as peneiras foram pesadas e a fração de biomassa retida em cada peneira foi determinada para análise estatística.

Anexo II – Medição de Umidade

A medição da umidade é feita aquecendo-se a biomassa com ondas infravermelho a 105 °C até que o valor da massa seja constante. A medição foi realizada no equipamento IV 2000 Analisador GEHAKA com as seguintes características:

SISTEMA DE SECAGEM:

- Controle de temperatura: 50 a 200° C;
- Faixa de medida: 0 a 100,0 %;
- Redibilidade: +/- 0,1%;
- Timer: 2 a 99 min;
- Rede: 220 VAC;
- Frequência: 50/60 Hz;
- Flutuação de rede: +10% -15%;
- Consumo: 280 watts;
- Dimensões totais (mm): Larg. 187 x Alt. 310 x Prof. 312;

BALANÇA:

- Carga Máxima: 210g;
- Redibilidade: 0,001g;
- Repetibilidade: +/- 0,001g;
- Linearidade: +/- 0,001g;
- Prato de alumínio: • = 110mm.

Anexo III – Determinação de Extrativos

A quantificação de extrativos de biomassa in natura foi feita utilizando-se um sistema Soxhlet, apresentado na Figura 53. O equipamento é composto por 6 conjuntos de um tubo condensador, um tubo extrator, um cartucho de papel e biomassa, um balão de vidro de fundo plano, pérolas de ebulição e manta de aquecimento (ver Figura 54).

Separou-se aproximadamente 30 g de eucalipto e mediu-se a umidade com o procedimento descrito no Anexo II. O procedimento só pôde ser iniciado, caso a umidade fosse inferior a 10%.



Figura 53: Sistema soxhlet para realizar a extração de material não estrutural.

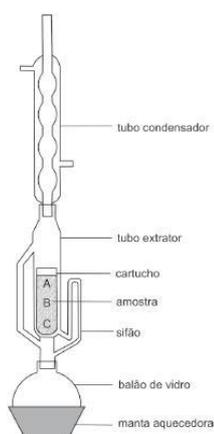


Figura 54: Figura esquemática do extrator soxhlet. A. zona areada, B: zona intermediária (sujeita a flutuações do nível de água) e C: zona submersa.

Os cartuchos que receberão a biomassa devem ser feitos a partir de papel filtro previamente secado e pesado (M_1). Deve-se adicionar aproximadamente 4 g de biomassa em base seca. Deve-se, então, considerar o valor da umidade (U) para determinar o valor a ser pesado (M_2):

$$M_2 = \frac{4}{1 - U}$$

A primeira extração é realizada utilizando-se 200 mL de etanol por balão, buscando-se manter 6 a 10 refluxos por hora durante 24h. Realiza-se mais 8h de ciclo de extração para assegurar-se da remoção de todos os extrativos. Posteriormente, faz-se a extração com 200 mL de água destilada, buscando-se uma taxa de 10 refluxos por hora durante 12h. O cartucho deve ser levado a estufa a 105 °C até alcançar peso constante e sua massa deve ser aferida (M_3). O teor de extrativos (E) é calculado como:

$$E = \frac{M_2 \cdot (1 - U)}{M_3 - M_1}$$

Anexo IV – Determinação de Cinzas

Cadinhos de porcelana são disponibilizados e levados a mufla por 2 h a 800 °C para eliminar qualquer resíduo de análise precedente. Após as 2h, a mufla é desligada e quando esta alcança 200 °C, os cadinhos são armazenados em um dessecado com vácuo. Após resfriamento, afere-se sua massa (M1). Colocar aproximadamente 1 g de biomassa em cada cadinho e pesar (M2). Aquecer os cadinhos em mufla a 105 °C e deixá-los por 12 min, 250 °C e deixá-los por 30 min e a 575 °C e deixá-los por 180 min. Após o procedimento, a mufla é desligada e quando esta alcança 200 °C, os cadinhos são armazenados em um dessecado com vácuo. Após resfriamento, afere-se sua massa (M3). O teor de cinzas (C) é calculado:

$$C = \frac{M_2}{M_3 - M_1}$$

Anexo V – Hidrólise Ácida dos Sólidos

O procedimento descrito a seguir não quantificar diretamente nenhum componente da biomassa, é um passo fundamental para determinar os teores de lignina e carboidratos estruturais.

Coloca-se uma quantia de aproximadamente 10 g de sólidos (seja biomassa in natura após remoção dos extrativos, seja sólidos obtidos em alguma corrente de processo) em estufa a 105 °C com recirculação de ar por 24h. Posteriormente, a amostra deve ser triturada em um moinho de facas. Peneira-se a biomassa triturada em uma peneira com abertura de 150 mesh.

Sempre em triplicata, colocar cerca de 0,300 g de biomassa moída em tubos de ensaio sem tampas e registrar a massa (M₀). Este valor será utilizado em diversos procedimentos a seguir. Em cada tubo de ensaio, adicionar 3 mL de ácido sulfúrico 72 % (m/m), um bastão de vidro e cobri-los com papel filme. Levá-los a banho a 30 °C por 1h. a cada 10 min, agitar os bastões. Encerrado o tempo, colocar os tubos de ensaio em banho de gelo até que a mistura esfrie.

Utilizando-se 84 mL de água destilada, remover a mistura reacional de dentro dos tubos e levá-los a frascos autoclaváveis de 250 mL. O frasco deve ser previamente pesado (M₁), bem como a massa do frasco mais meio reacional (M₂). Leve os frascos em autoclave a 1 barg e por 1h. após o final do ciclo do autoclave, esperar que os frascos esfriem, pese novamente o frasco (M₃) e filtre a solução obtida em papel filtro previamente secado e pesado. Após coletar o líquido, lave os sólidos com abundância de água (cerca de 1,5 L), até que o pH da água de lavagem seja neutro. As frações sólida e líquida devem ser congeladas até posterior análise. Calcula-se o favor de evaporação (F_E) da operação do autoclave:

$$F_E = \frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1}$$

Anexo VI – Determinação de Lignina Insolúvel

Partindo-se da fração de sólidos obtida no procedimento descrito no Anexo V (hidrólise ácida dos sólidos), faz-se necessário saber a massa do papel filtro seco (M_1). O sólido obtido e o papel filtro são levados à estufa por 48 h a 105 °C. Após remoção da estufa e resfriamento em dessecador, pesa-se o conjunto papel+sólidos (M_2). Coloca-se o conjunto em um cadinho de porcelana previamente pesado (M_3) e repete-se o procedimento de determinação de cinzas, descrito no Anexo III. A massa final de cadinho+cinzas é aferida (M_4). Considerando-se a massa de biomassa utilizada no Anexo V (M_0) e o teor de extrativos determinado (E), calcula-se o teor de lignina insolúvel (LI), também chamada de lignina de Klason:

$$LI = \frac{(M_2 - M_1 + M_4 - M_3)}{M_0} (1 - E)$$

Anexo VII – Determinação de Lignina Solúvel

Parte-se da fração líquida obtida no procedimento descrito no Anexo V (hidrólise ácida dos sólidos). Em balões de 25 mL, adiciona-se 1 mL da fração líquida obtida, 0,5 mL de solução de NaOH 6,5 mol/L e completa-se o volume com água destilada até 25 mL. Verificar se o pH está entre 12 e 13 – caso não esteja corrigir com ácido sulfúrico 72% (m/m) ou hidróxido de sódio. Transfira o conteúdo para uma cubeta e leia a absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 280 nm (AT). Para determinar-se a concentração de lignina solúvel, deve-se saber qual a concentração de furfural (CF) e 5-hidroxi-metil-furfural (CHMF), em g/L na mistura (Gouveia et al. 2009), descrito no anexo VIII. A concentração de lignina (CL), em g/L é dada pela equação:

$$C_L = 0,04187(A_T - 146,85.C_F - 114.C_{HMF}) - 0,0003279$$

O teor de lignina solúvel (LS), por sua vez, é calculado com os valores de concentração de lignina, o volume do filtrado (VF = 0,087 L), o fator de diluição utilizado (FD = 25), o fator de evaporação (FE, calculado no Anexo V) e a massa de sólidos utilizada na caracterização, descrita no Anexo V (M0) e pelos extrativos, descritos no Anexo III (E):

$$LS = \frac{C_L V_F F_D F_E}{M_0} (1 - E)$$

O teor de lignina total (LT) é dado pela soma dos teores de lignina solúvel e insolúvel:

$$L_T = LI + LS$$

Anexo VIII – Determinação de Carboidratos Estruturais

Conforme descrito na revisão bibliográfica deste trabalho, a biomassa é composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e grupos acetila. A degradação da celulose ou glicanas por catálise ácida pode levar a produção de glicose, celobiose e 5-hidroxi-metil-furfural; a degradação da hemicelulose ou xilanas pode levar a produção de xilose, arabinose, furfural e ácido acético. A degradação dos compostos dos grupos acetila levará a formação de ácido acético. Neste trabalho, considera-se que todo o ácido acético é proveniente dos grupos acetila e não da degradação da hemicelulose. Os fatores de conversão estequiométricos para cada reação são apresentados na Tabela 31.

Tabela 31: Fator de conversão estequiométricos polímero - monômero para as principais frações de biomassa.

Fatores de Conversão		
Polímero	Monômero	F _c
Glicanas	Glicose	0.90
	Celobiose	0.95
	5-HMF	1.29
Xilanas	Xilose	0.88
	Arabinose	0.88
	Furfural	1.37
Acetilas	A. Acético	0.72

Para esta análise, toma-se a fração líquida obtida no procedimento descrito no anexo V tal qual, com a devida diluição, e passa-se em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, Marca: Agilent; Modelo: 1260 Infinity), utilizando-se as colunas HPX 87H, detector de índice de refração para a medição de carboidratos e ácidos orgânicos e coluna C-18, detector de absorção no ultravioleta para a medição de furfural e 5-hidroxi-metil-furfural. A determinação dos teores de glicanas, xilanas e acetilas dependem do volume do filtrado (VF = 0,087 L), do fator de evaporação (FE,

calculado no Anexo V), da massa de sólidos utilizada na caracterização, descrita no Anexo V (M_0) e do teor de extrativos, descritos no Anexo III (E).

O teor de glicanas (G), xilanas (X) e acetilas (AC) são calculados:

$$G = \frac{(C_{glicose} F_{glicose} + C_{celobiose} F_{celobiose} + C_{5HMF} F_{5HMF}) \cdot V_F \cdot F_E}{M_0} (1 - E)$$

$$X = \frac{(C_{xilose} F_{xilose} + C_{arabinose} F_{arabinose} + C_{Furfural} F_{Fufural}) \cdot V_F \cdot F_E}{M_0} (1 - E)$$

$$AC = \frac{(C_{ac_acético} F_{ac_acético}) \cdot V_F \cdot F_E}{M_0} (1 - E)$$

Anexo IX – Determinação de Atividade Enzimática - Celulases

Preparo do reagente DNS

Para o preparo do reagente, são necessários os reagentes e quantidades listados na Tabela 32.

Tabela 32: Reagentes e quantias necessárias para a produção do reagente DNS

Substância	Massa (g)
Água	1000
Ácido 3.5-dinitrossalicílico	10.6
Hidróxido de Sódio	198
Fenol	7.6 mL
Metabissulfito de sódio	8.3
Tartarato de sódio e potássio	30.6

Inicialmente, dissolve-se 10,6 g de ácido dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1000 mL de água. Funde-se o fenol em banho Maria a 50 °C até obter 7,6 mL e dissolvê-lo junto a solução. A seguir, adiciona-se 8,3 g de metabissulfito de sódio. Separa-se 100 mL da solução preparada e adiciona-se 30,6 g tartarato de sódio e potássio na solução aquecida a 60 °C para acelerar a dissolução. Ao final, completa-se o volume com água a 146 mL.

Preparo da curva de calibração

Prepara-se 50 mL de solução mãe de glicose de 10 g/L, utilizando-se tampão de íon citrato como dissolvente. Fazer dissoluções da solução mãe em 10 tubos de ensaio, obtendo-se concentrações entre 10 g/L e 0,5 g/L. Transfira 0,5 mL de cada diluição a um tubo de ensaio com tampa com 1 mL de solução tampão. Em um tubo a parte (branco), adicione 1,5 mL de solução tampão. Leve todos os tubos de ensaio a banho termostático a 50 °C por 1h10min. Remova os tubos e adicione 3,0 mL de

reagente DNS e homogenizar. Leve os tubos a banho de água fervente por 5 min e depois resfrie-os em banho de gelo. O conteúdo dos tubos deve ser diluído em cubetas, adicionando 0,2 mL da mistura e 2,5 mL de água destilada. Realiza-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm, calibrando-o com o branco.

Medição da atividade enzimática

O ensaio deve ser realizado em replicatas. Para cada replicata, coloque 50 mg de papel Whatman nº 1 picado em 11 tubos de ensaio, sendo um destes utilizado como "branco". Neste tubo, adicione 1,5 mL de solução tampão de íon citrato. Prepare uma solução mãe de enzima diluída – o fator de diluição dependerá da atividade enzimática; quanto mais ativa, maior deve ser a diluição. A partir da solução mãe, faça 10 diluições (fatores de diluição variando entre 300 e 1700 podem atender a necessidade, mas estes valores dependerão da atividade do coquetel). Nos 10 tubos tampados, 1,0 mL de tampão levam-se a banho maria a 50 °C por 10 min. Adicione 0,5 mL das diluições em cada tubo e deixem-nos em banho por 60 min. Remova os tubos e adicione 3,0 mL de reagente DNS e homogenizar. Leve os tubos a banho de água fervente por 5 min e depois os resfrie em banho de gelo. O conteúdo dos tubos deve ser diluído em cubetas, adicionando 0,2 mL da mistura e 2,5 mL de água destilada. Realiza-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm, calibrando-o com o branco.

Anexo X – Determinação de atividade enzimática – β -Glicosidase

Reagentes

Para este ensaio, utilizam-se os reagentes celobiose (Sigma-Aldrich) e kit GOD-PAP

Preparo da curva de calibração

Prepara-se 50 mL de solução mãe de glicose de 4 g/L, utilizando-se tampão de íon citrato como dissolvente. Fazer dissoluções da solução mãe em 10 tubos de ensaio, obtendo-se concentrações entre 4 g/L e 0,1 g/L. Transfira 20 μ L de cada diluição a um tubo de ensaio com tampa com 2,0 mL de solução GOD-PAP. Em um tubo a parte (branco), adicione 2,0 mL de solução GOD-PAP. Leve todos os tubos de ensaio a banho termostático a 37 °C por 10 min. Remova os tubos e adicione 3,0 mL de reagente água destilada e homogenizar. Leve os tubos a banho de água fervente por 5 min e depois resfrie-os em banho de gelo. O conteúdo dos tubos deve ser vertido em cubetas, adicionando. Realiza-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm, calibrando-o com o branco.

Medição da atividade enzimática

O ensaio deve ser realizado em replicatas. Prepare uma solução mãe de enzima diluída – o fator de diluição dependerá da atividade enzimática; quanto mais ativa, maior deve ser a diluição. A partir da solução mãe, faça 9 diluições (fatores de diluição variando entre 1500 e 13000 podem atender a necessidade, mas estes valores dependerão da atividade do coquetel). Para cada replicata, separe 10 tubos de ensaio, sendo um destes utilizado como “branco”. Neste tubo, adicione 2,0 mL de solução tampão de íon citrato. Nos 9 tubos tampados, 1,0 mL de tampão e 1,0 mL das respectivas enzimas. levam-se a banho maria a 50 °C por 10 min.

Prepare 50 mL de solução 15 mmol/L de celobiose. Sem remover os tubos do banho, adicione 1,0 mL de solução de celobiose e deixem-nos em banho por 30 min. Leve os tubos a banho de água fervente por 5 min e depois os resfrie em banho de gelo. Transfira 20 μ L de cada diluição a um tubo de ensaio com tampa com 2,0 mL de solução GOD-PAP. Em um tubo a parte (branco), adicione 2,0 mL de solução GOD-PAP. Leve todos os tubos de ensaio a banho termostático a 37 °C por 10 min. Remova os tubos e adicione 3,0 mL de reagente água destilada e homogenizar. Leve os tubos a banho de água fervente por 5 min e depois resfrie-os em banho de gelo. O conteúdo dos tubos deve vertido em cubetas, adicionando. Realiza-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm, calibrando-o com o branco.

Anexo XI – Determinação de atividade enzimática – Xilanase

As misturas reacionais contendo 50 µL de solução 0,5 % (m/v) do substrato dissolvido em água, 30 µL de tampão citrato 0,05 M, pH 4,8, e 20 µL de extrato enzimático foram preparadas em microplacas para PCR de 96 poços e tampadas com selo de silicone. O substrato utilizado foi xilana de madeira faia (xilana beechwood – Sigma-Aldrich). As reações foram incubadas por 10 minutos a 50°C e paralisadas pela adição de 100 µL de solução de DNS. Em seguida, as amostras foram incubadas a 99 °C por 5 minutos e resfriadas em banho de gelo para estabilização da coloração. Como reações controle, foram preparadas misturas reacionais contendo os mesmos volumes anteriores de substrato e tampão que também foram incubadas a 50 °C por 10 minutos. Após a paralisação das reações controle com a solução de DNS, foi adicionado 20 µL do extrato enzimático e realizada a incubação a 99 °C por 5 minutos. Alíquotas de 100 µL das amostras reacionais foram transferidas para microplacas de leitura e as absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro (Infinite® 200 PRO – TECAN) a 540 nm. As atividades enzimáticas foram calculadas usando uma curva de calibração preparada com D-glicose (Sigma-Aldrich). Uma unidade de atividade enzimática (U/mL) foi definida como 1 µmol de açúcares redutores liberados por minuto por mL de enzima a 50 °C nas condições de ensaio.

Anexo XII – Rendimento de Pré-Tratamento

O procedimento descrito a seguir é utilizado para determinar o rendimento mássico do pré-tratamento, ou seja, a quantidade de biomassa que permanece na fase sólida após o processo. Pesa-se a biomassa e respectiva umidade antes da etapa de pré-tratamento (M_0 e u_0). Após o pré-tratamento – seja qual for – separa-se a fase sólida da fase líquida por filtração e, sem perder amostra, coloca-se a biomassa para secar por convecção natural a temperaturas inferiores a 60 °C, preferencialmente ambiente. Ao atingir massa constante, afere-se a massa final e umidade final (M_f e u_f). O rendimento de pré-tratamento (η_{PT}) é calculado como:

$$\eta_{PT} = \frac{M_f(1 - u_f)}{M_0(1 - u_0)}$$

Anexo XIII – Determinação de carboidratos solúveis

Para esta análise, toma-se a fração líquida, com a devida diluição, e passa-se em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, Marca: Agilent; Modelo: 1260 Infinity), utilizando-se as colunas HPX 87H, detector de índice de refração para a medição de carboidratos e ácidos orgânicos e coluna C-18, detector de absorção no ultravioleta para a medição de furfural e 5-hidroxi-metil-furfural. A determinação dos teores de glucoligômeros, xiloligômeros e grupos acetila oligoméricos dependem da massa específica do filtrado (ρ_l , em g/L), do fator de evaporação (F_E , calculado no Anexo V), do rendimento de pré-tratamento (η_{PT} , calculado no Anexo XII), do fator de diluição (F_D) e da .

O teor de glicanas tal qual (GTQ), xialanas tal qual (XTG) e grupos acetilas tal qual (ACTQ), em fração mássica, são calculados:

$$GTQ = \frac{(C_{glicose} F_{glicose} + C_{celobiose} F_{celobiose} + C_{5HMF} F_{5HMF}) \cdot F_E \cdot F_D}{\rho_l M_t \eta_{PT}}$$

$$XTG = \frac{(C_{xilose} F_{xilose} + C_{arabinose} F_{arabinose} + C_{Furfural} F_{Furfural}) \cdot F_E \cdot F_D}{\rho_l M_t \eta_{PT}}$$

$$ACTQ = \frac{(C_{ac_acético} F_{ac_acético}) \cdot F_E \cdot F_D}{\rho_l M_t \eta_{PT}}$$

Anexo XIV – Hidrólise Ácida do Líquido

O procedimento descrito a seguir é utilizado para quantificar carboidratos e grupos acetila em sua forma oligomérica. A partir da fase líquida obtida na separação sólido-líquido da polpa obtida em qualquer etapa do processo, toma-se 5, 10 ou 20 mL segundo disponibilidade e afere-se o pH. Com base na normativa do NREL (Hames et al. 2008), adiciona-se o volume apropriado de solução de ácido sulfúrico 72%. Misturam-se o licor e o ácido em um frasco Schott-Duran, que é fechado e levado em autoclave por 1h a 121°C. Após o fim do ciclo de autoclave,

Conforme descrito na revisão bibliográfica deste trabalho, a biomassa é composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e grupos acetila. A degradação da celulose ou glicanas por catálise ácida pode levar a produção de glicose, celobiose e 5-hidroxi-metil-furfural; a degradação da hemicelulose ou xilanas pode levar a produção de xilose, arabinose, furfural e ácido acético. A degradação dos compostos dos grupos acetila levará a formação de ácido acético. Neste trabalho, considera-se que todo o ácido acético é proveniente dos grupos acetila e não da degradação da hemicelulose. Os fatores de conversão estequiométricos para cada reação são apresentados na Tabela 31.

Para esta análise, toma-se a fração líquida, com a devida diluição, e passa-se em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, Marca: Agilent; Modelo: 1260 Infinity), utilizando-se as colunas HPX 87H, detector de índice de refração para a medição de carboidratos e ácidos orgânicos e coluna C-18, detector de absorção no ultravioleta para a medição de furfural e 5-hidroxi-metil-furfural. A determinação dos teores de glucoligômeros, xiloligômeros e grupos acetila oligoméricos dependem da massa específica do filtrado (ρ_i , em g/L), do fator de evaporação (F_E , calculado no Anexo V), do rendimento de pré-tratamento (η_{PT} , calculado no Anexo XII), do fator de diluição (F_D) e da .

O teor de glicoligômeros totais (GOT), xiloligômeros totais (XOT) e grupos acetilas oligoméricos totais (ACOT), em fração mássica, são calculados:

$$GOT = \frac{(C_{glucose} F_{glucose} + C_{celobiose} F_{celobiose} + C_{5HMF} F_{5HMF}) \cdot F_E \cdot F_D}{\rho_l M_t \eta_{PT}}$$

$$XOT = \frac{(C_{xilose} F_{xilose} + C_{arabinose} F_{arabinose} + C_{Furfural} F_{Furfural}) \cdot F_E \cdot F_D}{\rho_l M_t \eta_{PT}}$$

$$ACOT = \frac{(C_{ac_acético} F_{ac_acético}) \cdot F_E \cdot F_D}{\rho_l M_t \eta_{PT}}$$

O teor de glicoligômeros (GO), xiloligômeros (XO) e grupos acetilas oligoméricos (ACO) são calculados pela subtração entre seu respectivo carboidrato tal qual (GTQ, XTQ e ACTQ):

$$GO = GOT - GTQ$$

$$XO = XOT - XTQ$$

$$ACO = ACOT - ACTQ$$