



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

EMANUEL MENESES BARROS

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEAS A PARTIR DE BAGAÇO DE CAJU PRÉ-TRATADO COM ÁCIDO-
ÁLCALI**

FORTALEZA

2015

EMANUEL MENESES BARROS

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEAS A PARTIR DO BAGAÇO DE CAJU PRÉ-TRATADO COM ÁCIDO-
ÁLCALI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Engenharia Química. Área de concentração: processos químicos e bioquímicos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Valderez Ponte Rocha.

FORTALEZA

2015

EMANUEL MENESES BARROS

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEAS A PARTIR DE BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM ÁCIDO-ÁLCALI:
CULTIVOS DESCÓNTÍNUOS E SEMI-CONTÍNUOS**

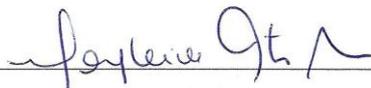
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 25 / 08 / 2015.

BANCA EXAMINADORA

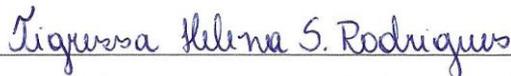


Prof. Dr. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Morsyleide de Freitas Rosa

Embrapa



Dr. Tigressa Helena Soares Rodrigues

Embrapa

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia – BPGE

-
- B276p Barros, Emanuel Meneses.
 Produção de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas a partir de bagaço de caju pré-tratado com Ácido-Álcali / Emanuel Meneses Barros. – 2015.
 82 f. : il. color. enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2015.
 Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.
 Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
 Coorientação: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.
1. Engenharia química. 2. Enzimas. 3. Etanol - Produção. I. Título.

“Á Deus, à minha família, e aos meus verdadeiros amigos.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me dado o dom da vida, garra, inteligência e sabedoria para a realização desse trabalho.

Aos meus pais: Vanderley e Cesarina e minhas irmãs: Emanuelle e Emilly, pelo apoio financeiro e moral, compreensão e incentivo nos momentos mais difíceis e na minha vida pessoal e profissional.

À Profa. Dra Luciana Rocha Barros Gonçalves pela oportunidade dada a mim desde a iniciação científica, pela paciência, dedicação, pelos conhecimentos passados e, principalmente, por acreditar em mim desde o início.

À ProfaDra Maria Valderez Ponte Rocha pela paciência, compreensão, amizade e conselhos nos momentos mais difíceis. Agradeço de coração por ter passado o seu conhecimento e por ter me ajudado tanto, com muita disposição. Esse trabalho não teria sido possível sem você.

À Rebecca, minha companheira, que sem seu suporte emocional e afetivo a construção desse trabalho seria mais pesada, pois sempre me ajudou a superar os meus desafios com muito amor.

À Tigressa, pelo seu suporte que foi fundamental desde o início, me passando os seus conhecimentos necessários para a realização desse trabalho e pela amizade ao longo dos anos de pesquisa.

Aos meus amigos do GPBio, pelo apoio emocional e pela amizade, que faz com que a rotina seja menos desgastante e pela ajuda na realização do trabalho: Victor, Jessyca, Juciane, Carla, Jocélia, Alice, Edvan, Renata, Ítalo, Tiago, Andro, Juliana, Nathalia, Kamilly, Ticiane, Camila e Celina. Em especial, agradeço ao Victor, pela amizade e agradabilíssimo convívio, que sempre esteve disponível para me ajudar com muita perspicácia e pro-atividade, contribuindo demasiadamente para a execução desse trabalho. Também à Jessyca, Juciane e Carla, que sempre me ajudaram muito nos momentos que mais precisei, pelo agradabilíssimo convívio e pela amizade construída dentro do grupo.

Agradeço, também, a CAPES pelo suporte financeiro, necessário para a realização desse trabalho, e a Sucos do Brasil pelo fornecimento da matéria-prima.

*“A coisa mais importante é dar o primeiro passo,
superar um medo bravamente e dar coragem para
superar o próximo desafio”*

Daisaku Ikeda

RESUMO

Neste trabalho foi estudada a produção de etanol por processos de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF) usando o bagaço de caju pré-tratado com ácido-álcali (CAB-OH) como matéria-prima. Nos processos de SSF foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 e o complexo enzimático Celluclast 1.5L (30 FPU.g_{celulose}⁻¹). Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio SSF (tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8; suplementado com 1 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de sulfato de amônio, e a carga de CAB-OH desejada em %m/V), a concentração inicial de células de 5 g/L, temperatura de 40°C e rotação de 150 rpm. Primeiramente, um processo em batelada foi realizado para avaliar a necessidade de suplementação com a enzima celobiase (NS50010–Novozymes) com atividade de 60 CBU/g_{celulose}⁻¹. O processo SSF conduzido com a suplementação de celobiase obteve uma maior produção máxima de etanol (30 g/L) e maior eficiência (93%) em relação ao não-suplementado, sendo os estudos posteriores conduzidos com as enzimas celulasas e celobiasas. Em seguida, realizou-se o estudo da avaliação da carga de CAB-OH (7,5, 10, 15 e 20 %m/V), em processos sem pré-sacarificação (SSF) e com pré-sacarificação (PSSF). A maior concentração de etanol (58 g/L) ocorreu nos processos SSF com carga de 15%, sendo esse também o de maior produtividade, e PSSF com carga de 20%, não apresentando diferença significativa na produção máxima de etanol entre os dois processos. No entanto, os processos SSF e PSSF usando 10% CAB-OH apresentaram a maior eficiência (98%) e rendimento global em etanol do estudo (40 g_{Etanol}/Kg_{CAB}). Posteriormente, foram realizadas estratégias de alimentação, em conjunto com processos SSF, de forma a eliminar efeitos inibitórios presentes em processos em batelada com elevadas cargas de sólidos. Foram avaliadas estratégias de alimentação de substrato: duas com carga inicial de 10% e atingindo 20% (uma com duas alimentações e outra com quatro) e uma com carga inicial de 15% e final de 25% (quatro alimentações). Todos os processos, exceto os de carga de 7,5%, apresentaram %V_{etanol}/V_{solução} acima de 4% e os processos em batelada alimentada atingiram a maior produção de etanol do estudo (68 g/L). Os processos com carga inicial de 10% e final de 20% apresentaram uma maior eficiência (81%), porém o processo que apresentou maior produtividade foi com carga inicial de 15% e final de 25% (2,4 g/L.h), e também rendimento global em etanol elevado (32 g_{Etanol}/Kg_{CAB}), de forma que esse foi o processo com melhores resultados do presente estudo. Com isso, o CAB-OH se mostrou um substrato promissor para a produção de etanol por processos SSF e PSSF, conduzido em batelada e batelada alimentada, utilizando elevadas cargas de sólidos.

Palavras chave: Batelada alimentada; *Kluyveromyces marxianus*; pré-sacarificação,

ABSTRACT

In this work was studied ethanol production from cashew apple bagasse after acid followed by alkali pretreatment (CAB-OH) using the Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) processes. In SSF process was utilized the yeast *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 and the enzymatic complex Celluclast 1.5L (30 FPU.g_{cellulose}⁻¹). The assays were conducted in 250mL Erlenmeyer flasks with 100mL of culture medium (sodium citrate buffer 50mM pH 4.8, supplemented with yeast extract 1 g/L and ammonium sulfate 1 g/L and the desired bagasse concentration in %w/v), the initial cells concentration was 5 g/L, the temperature was 40°C and 150rpm of rotation. First, a batch process was performed to evaluate the enzymatic supplementation of culture medium with cellobiase (NS50010- Novozymes) with an activity of 60 CBU.g_{cellulose}⁻¹. The supplemented process with cellobiase had the highest ethanol production (30 g/L) and ethanol efficiency (93%) than the non-supplemented and the subsequent studies were performed with supplementation. After, was realized the evaluation of CAB-OH load (7.5, 10, 15 e 20% w/V) in processes with (PSSF) and without pre-saccharification (SSF). The highest ethanol production corresponded to SSF processes with bagasse load of 15%, this being also the highest productivity, and PSSF with bagasse concentration of 20% and these processes were statistic similar within the standard deviation of the samples in relation to ethanol production. However, the SSF and PSSF processes with 10% of dry matter had the highest efficiency (98%) and yield feedstock in ethanol of study (32 g_{Ethanol}/Kg_{CAB}). After, feeding strategies with SSF processes have been made to eliminate inhibitory effects in batch processes with high loadings of solids. There were evaluated feeding strategies: two with initial CAB-OH load of 10% and 20% in the end (a strategy with two feeds and one with four) and another with initial load of 15% and final of 25% (with four feeds). All processes, with the exception of 7.5% load, had %V_{ethanol}/V_{solution}⁻¹ above 4% and the fed batch processes reached a similar ethanol production (68 g/L), towering in 17% the ethanol concentration compared to batch process with load of 20%. All processes, with the exception of 7.5 % load, had %V_{ethanol}/V_{solution} above 4% and the fed batch processes reached the highest ethanol production of study (68 g/L). The processes with initial load of 10 % and final of 20 % reached a higher efficiency (81 %), but the process that reached the highest productivity was the process with the initial load of 15 % and final of 25 % (2,4 g/L.h), and high ethanol global yield too (32 g_{Ethanol}/Kg_{CAB}), so this process achieved the best results of present study. Based on the results presented, CAB-OH showed a promising substrate for ethanol production by SSF and PSSF processes, conducted by batch and fed batch method, using high loadings of solids.

Keywords: Fed-batch; *Kluyveromyces marxianus*; pre-saccharification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Usinas produtoras de etanol no estado do Ceará: Cariri II, localizada no município de Ubajara, (A) e Cariri I, localizada no município de Barbalha (B).....	20
Figura 2. Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.).....	21
Figura 3. Bagaço de caju <i>in natura</i>	22
Figura 4. Estrutura da Celulose	24
Figura 5. Transformação bioquímica do piruvato a etanol.....	31
Figura 6. Diagrama de blocos para o processo de transformação da biomassa lignocelulósica em etanol através de hidrólise e fermentação separadas (SHF).	35
Figura 7. Diagrama de blocos para a transformação da biomassa lignocelulósica em etanol através de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).	36
Figura 8. Diagrama de blocos da transformação da biomassa lignocelulósica em etanol através de sacarificação e fermentação simultâneas com pré-sacarificação (PSSF).	37
Figura 9. Fluxograma de processo de Sacarificação Fermentação Simultâneas (SSF) em batelada alimentada para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica.	39
Figura 10. Perfis de concentrações de glicose, celobiose, xilose e etanol com o tempo para os processos SSF utilizando a levedura <i>K. marxianus</i> a 40°C e 150 rpm e 7,5% de CAB-OH, sem suplementação (A) e com suplementação (B) de celobiasas do complexo NS50010 (384,28 CBU/mL) com atividade de 60 CBU/g _{celulose} . Glicose (■); Xilose (▲); Celobiose (▲) e Etanol (●).....	53
Figura 11. Perfis de concentrações de glicose, xilose etanol com o tempo, para os processos SSF e PSSF utilizando a levedura <i>K. marxianus</i> a 40 °C e 150 rpm, usando diferentes cargas de bagaço de caju (CAB-OH em %m/V): SSF 7,5 % (A), PSSF 7,5 % (B), SSF 10 % (C), PSSF 10 % (D), SSF 15 % (E) e PSSF 15 % (F). Glicose (■); Xilose (▲) e Etanol (●). Linha tracejada na vertical representa a separação entre a etapa de pré-sacarificação e a etapa de sacarificação	57
Figura 12. Perfis de concentrações de glicose, xilose e etanol com o tempo para o processo PSSF (adição da levedura <i>K. marxianus</i> com 12 h de sacarificação) com carga de CAB-OH de 20 %. Glicose (■); Xilose (▲) e Etanol (●). Linha tracejada na vertical representa a separação entre a etapa de pré-sacarificação e a etapa de sacarificação e fermentação simultâneas.....	58
Figura 13. Perfis de concentrações de glicose, xilose e etanol com o tempo para os processos SSF em batelada alimentada com carga inicial (%m/V) de CAB-OH de 10 % e carga final de	

20 %, com estratégia de duas alimentações (A) e quatro alimentações (B), sendo FB1 e FB2, respectivamente. As linhas tracejadas na vertical correspondem aos pontos de alimentações de bagaço CAB-OH. Glicose (■); Xilose (▲) e Etanol (●).....	62
Figura 14. Perfis de concentração de glicose, xilose e etanol com o tempo para o processo em batelada alimentada com carga inicial (%m/V) de 15% e final de 25% com estratégia de alimentação de 4 alimentações (FB3). As retas tracejadas na vertical correspondem às alimentações de substrato. Glicose (■); Xilose (▲) e Etanol (●).	65
Figura 15. Fluxograma representativo do balanço de massa nas etapas do processo de produção de etanol por Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF) a partir do bagaço do pedúnculo do caju.....	70
Figura 16. $Y_{E/CAB}$ (g_{Etanol}/g_{CAB}) para os processos SSF com carga de 10 e 15%, para o PSSF com carga de 20% e para o processo SSF em batelada alimentada com carga inicial de 10% e final de 10% com quatro alimentações (FB2).	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estratégias de alimentação adotadas no presente estudo para sacarificação e fermentação simultâneas do bagaço CAB-OH.....	48
Tabela 2. Análise composicional do bagaço de caju <i>in natura</i> e após o pré-tratamento ácido-álcali (CAB-OH).	52
Tabela 3. Parâmetros cinéticos calculados para os processos SSF com meio suplementado com celobioses do complexo NS50010 (384,28 CBU/mL) e atividade de 60 CBU/gcelulose ⁻¹ e não-suplementado.	50
Tabela 4. Parâmetros cinéticos calculados para os processos SSF e PSSF a 40 °C usando a levedura <i>K. marxianus</i> ATCC 36907, com diferentes cargas de bagaço de caju.....	59
Tabela 5. Parâmetros calculados para os processos em batelada alimentada com carga inicial (%m/V) de 10% de CAB-OH e final de 20% (com duas e quatro alimentações) e a batelada alimentada com carga inicial (%m/V) de 15% e final de 25% com quatro alimentações, além do processo PSSF em batelada com carga de 20%.	66

NOMENCLATURA

CAB	Bagaço de cajui <i>natura</i>
CAB_T	Bagaço de caju <i>in natura</i> resultante após o tratamento primário
CAB-H	Bagaço de caju pré-tratado com ácido
CAB-OH	Bagaço de caju pré-tratado com ácido-álcali
SHF	Sacarificação e fermentação separadas
SSF	Sacarificação e fermentação simultâneas
PSSF	Sacarificação e fermentação simultâneas com pré-sacarificação
FB	Processo em batelada alimentada
FPU	Atividade da enzima celulase expressa em unidades de papel de filtro
CBU	Atividade da enzima celobiase expressa em unidades de celobiose
η	Eficiência de processo
f	Fração de celulose na biomassa lignocelulósica
Q_P	Produtividade de etanol
% V_{etanol}/V_{solução}	Porcentagem volume de etanol por volume de solução
P_{máx}	Produção máxima de etanol
Rec_{SOL}	Fração do bagaço de caju recuperada após o pré-tratamento ácido-álcali

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Etanol e os cenários de sua produção e consumo no Brasil	19
2.2.Agroindústria do caju	21
2.3.Produção de etanol por biomassa lignocelulósica	23
2.3.1.Biomassa lignocelulósica	24
2.3.1.1.Celulose	24
2.3.1.2.Hemicelulose	24
2.3.1.3.Lignina.....	25
2.3.2.Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	25
2.3.2.1.Pré-tratamento ácido-álcali	26
2.3.2.2.Hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos	28
2.3.2.3.Fermentação alcoólica	30
2.3.2.4.Micro-organismos produtores de etanol	32
2.3.3.Estratégias para produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica	34
2.3.3.1.Estratégias para produção de etanol em batelada.....	34
2.3.3.2.Estratégias de produção de etanol em batelada alimentada	38
3.MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1.Micro-organismo	42
3.2.Material lignocelulósico	42
3.3.Tratamento primário da matéria lignocelulósica	42
3.4.Pré-tratamento do material lignocelulósico	42
3.5.Caracterização do material lignocelulósico	43
3.6.Complexos enzimáticos	43
3.7.Determinação da atividade enzimática dos complexos enzimáticos	44
3.7.1.Atividade de celulasas, por Unidades de Papel de Filtro (FPU), no complexo Celluclast 1.5L.....	44
3.7.2.Atividade de celobiasas, por Unidades de Celobiose (CBU), no complexo NS50010	44
3.8.Meios de cultura	45
3.8.1.Meios de propagação e manutenção de células	45
3.8.2.Meios para processos de sacarificação e fermentação simultâneas	45

3.9.Processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).....	45
<i>3.9.1.Preparo do inoculo</i>	<i>46</i>
<i>3.9.2.Avaliação da suplementação enzimática do meio SSF em batelada.</i>	<i>46</i>
<i>3.9.3.Avaliação da carga inicial de bagaço em processos, com e sem pré-sacarificação, em batelada.....</i>	<i>46</i>
<i>3.9.4.Avaliação de estratégias de alimentação de bagaço em processos de sacarificação e fermentação simultâneas.</i>	<i>47</i>
3.10.Métodos analíticos	48
3.11.Parâmetros de eficiência e rendimento.....	48
<i>3.11.1.Eficiência de processo (η)</i>	<i>48</i>
<i>3.11.2.Porcentagem de volume de etanol em volume de solução ($\%V_{etanol}/V_{solução}$).....</i>	<i>49</i>
<i>3.11.3.Produtividade de etanol</i>	<i>49</i>
3.12.Análise Estatística.....	50
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1.Caracterização da matéria-prima.....	51
4.2.Avaliação da suplementação enzimática do meio SSF em batelada	53
4.3.Avaliação da carga inicial de bagaço no processo SSF, com e sem pré-sacarificação, em batelada.	55
4.4.Avaliação de estratégias de alimentação de bagaço no processo de sacarificação e fermentação simultâneas.....	62
4.5.Balanço de massa	70
5.CONCLUSÕES.....	73
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, tecnologias em desenvolvimento de pesquisas em biocombustíveis, como, por exemplo, o etanol, que sejam fontes de energia renováveis e menos prejudiciais ao meio ambiente, tem sido investigado. Diversos estudos mostram que, quando comparado com a gasolina, o etanol brasileiro reduz as emissões dos chamados gases de efeito estufa (GEE) em cerca de 90%, e, em termos absolutos, a redução anual de emissão de gases de efeito estufa advinda do consumo de etanol e bioeletricidade poderá crescer das atuais 46 milhões de toneladas de CO₂ anuais para 112 milhões de toneladas no ano de 2020 (UNICA, 2015).

Brasil e Estados Unidos são os maiores produtores e exportadores mundiais de etanol. De acordo com especulações de consultoria mercado, a produção brasileira na safra 2015/2016 pode atingir recorde de 29,11 bilhões de litros, volume 3,3% acima do produzido no ciclo 2014/2015, mostrando a importância da produção dessa substância na atualidade (UDOP, 2015). O etanol é produzido industrialmente de fontes de açúcar ou amido, como cana-de-açúcar, milho, beterraba e sorgo. Nos Estados Unidos, a maior parte da produção de etanol provém do milho, enquanto que no Brasil a produção ocorre através da cana-de-açúcar¹.

A produção de etanol com base nos açúcares da cana já é uma tecnologia madura, e não há muito espaço para grandes aumentos de rendimento, em particular na fase industrial (BNDES, 2008). Um fator que viria a baratear o preço do etanol e aumentaria a sua produção seria utilização de diferentes matérias-primas e de baixo custo, pois, a mesma é responsável por 60 a 70% do custo final do etanol (MACHADO, 2010). Como matéria-prima alternativa e de baixo custo, pode-se citar o bagaço obtido do pedúnculo do caju. A cultura do caju é de fundamental importância para a economia do Nordeste brasileiro. Segundo dados do IBGE, a estimativa nacional para a safra de castanha de caju, no ano de 2015, é de 237.135 toneladas (TEIXEIRENSE, 2015), sendo o Ceará o maior produtor (SULDOPIAÚ, 2015). A Cadeia Produtiva da cajucultura está presente hoje em 60 municípios zoneados e exerce um importante papel socioeconômico no Estado. Destaca-se na produção de alimentos e na geração de empregos – 25 mil no campo e 16 mil na indústria².

¹ Disponível no portal do novaCana: <http://www.novacana.com/etanol/sobre-etanol/>, acesso em maio de 2015

² Disponível no portal do SINDICAJU: <http://sindicaju.org.br/perfil-do-setor/cadeia-produtiva/>. Acesso em junho de 2015

Mesmo o suco integral sendo o principal produto, com produção da ordem de 70 mil toneladas/ano, seu aproveitamento global por processos de agroindustrialização beneficia somente de 10 a 20% da produção anual do pedúnculo de caju no Nordeste brasileiro. Apesar da importância socioeconômica, a cultura do caju apresenta um baixo nível de aproveitamento do pedúnculo, com o desperdício de 80 a 90% da sua produção³.

Os processos industriais para obtenção de pedúnculo resultam na produção de 10-15% m/m de bagaço, o que essencialmente não tem valor comercial e é geralmente descartado pela indústria local (CORREIA *et al.*, 2015). Esses fatores agregam potencial para a utilização do bagaço de caju como matéria-prima alternativa e de baixo custo (<R\$ 0,25/Kg) para a produção de etanol de segunda geração (RODRIGUES, 2014).

Vários estudos têm sido realizados com a utilização do pedúnculo do caju para a produção de etanol, seja a partir do suco de caju (PINHEIRO *et al.*, 2008, 2012; PINHEIRO, 2011; BARROS, 2013), ou a partir do bagaço do caju (ROCHA *et al.*, 2011; CORREIA, 2013; RODRIGUES, 2014; BARROS *et al.*, 2014).

A tecnologia de conversão de biomassa lignocelulósica em carboidratos para posterior produção de etanol vem sendo considerada como uma das alternativas mais promissoras em substituição aos combustíveis convencionais derivados do petróleo (HASUNUMA; KONDO, 2012; ZHANG *et al.*, 2013;).

Para a produção do biocombustível a partir desses materiais, em geral, o processo baseia-se na etapa inicial de pré-tratamento. Esse age desestruturando a matriz lignocelulósica, reduzindo a quantidade de lignina e hemicelulose e modificando a cristalinidade da celulose deixando-a mais susceptível ao ataque enzimático (GUILHERME, 2014). Várias tecnologias de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos têm sido estudadas, como o pré-tratamento ácido seguido de álcali (ZHANG *et al.*, 2010; ROCHA, 2010; RODRIGUES, 2014).

Em seguida, é realizada uma hidrólise enzimática (ou sacarificação) do material pré-tratado para que os monossacarídeos provenientes da celulose sejam convertidos em etanol por micro-organismos etanologênicos (LIN *et al.*, 2013).

Esses processos podem ser conduzidos em sequência, conhecido por Sacarificação e Fermentação Separadas (SHF) ou em uma única etapa, Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF), sendo que esses últimos podem ser conduzidos com uma

³Disponível no portal da Embrapa: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>, acesso em maio de 2015. Autor: Raimundo Marcelino da Silva Neto.

etapa inicial de pré-sacarificação da biomassa (PSSF). O objetivo da pré-sacarificação é hidrolisar parcialmente a celulose em açúcares monoméricos e oligoméricos antes da adição de levedura, o que aumentaria a taxa de produção de etanol durante a parte inicial da SSF (ÖGREN *et al*, 2007; HOYER *et al*, 2013).

Além disso, o estudo de estratégias de alimentação gradual de substrato, em conjunto com processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), com o objetivo de aumentar a concentração de etanol no caldo fermentado e, ao mesmo tempo, eliminar problemas relacionados à inibição da atividade enzimática e/ou fermentativa, devido a elevadas concentrações de substrato, produto e inibidores nos processos em batelada têm sido reportados na literatura (PAULOVÁ *et al*, 2014; PESSANI *et al*, 2011; YANG *et al*, 2010; ZHANG *et al*, 2010; LIU *et al*, 2010; RUDOLF *et al*, 2005).

Contudo, no processo simultâneo, a temperatura ótima para a sacarificação é mais elevada do que pode ser tolerada pela maioria das leveduras produtoras de etanol, fato que poderia ser otimizado através do uso de leveduras termotolerantes (LIN *et al*, 2013). Nesse sentido, *Kluyveromycesmarxianus*, devido a sua capacidade termotolerante, é a levedura mais indicada para a produção de etanol de segunda geração, especialmente por SSF (BALLESTEROS *et al*, 2004; FONSECA *et al*, 2008; CUNHA *et al*, 2013). Diversos trabalhos já têm explorado o potencial de cepas de *Kluyveromycesmarxianus* para a produção de etanol a partir do bagaço de caju (RODRIGUES, 2014; CORREIA, 2013).

Dessa forma, no presente trabalho, foram realizados processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) do bagaço de caju pré-tratado com ácido-álcali, utilizando *Kluyveromycesmarxianus* ATCC36907, uma levedura termotolerante. As etapas do estudo e seus objetivos foram:

- Determinar a necessidade de suplementação do processo SSF com complexo rico em celobiase.
- Determinar a carga de bagaço no processo SSF, com e sem pré-sacarificação.
- Recomendar estratégias de alimentação, em conjunto com os processos SSF.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Etanol e os cenários de sua produção e consumo no Brasil

Etanol, ou álcool etílico (C_2H_5OH), é uma substância orgânica transparente caracterizada pelo forte odor e é produzido pela fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução do acetaldeído (SANTOS, 2002). Em sua forma pura (álcool anidro), ele é muito utilizado na indústria, sendo matéria-prima na produção de tintas, solventes, aerossóis, etc. Além disso, ele é utilizado como combustível misturado à gasolina, em proporção obrigatória no Brasil de 27% (MATOSO, 2015). Já o etanol hidratado (etanol com cerca de 5% de água), é utilizado na produção de bebidas, alimentos, cosméticos, aromatizantes, produtos de limpeza, remédios, vacinas e como combustível de veículos, sendo essa última a maior aplicação desse produto⁴.

Um fato que marcou o impulso da produção de álcool etílico no Brasil foi a implantação do Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool), que foi criado no governo de Ernesto Geisel, em 14 de novembro de 1975 pelo Decreto nº 76.593, com o objetivo de estimular a produção do álcool, visando o atendimento das necessidades do mercado interno e externo e da política de combustíveis automotivo (TEIXEIRA, 2005). De 1975 a 2000, foram produzidos cerca de 5,6 milhões de veículos a álcool hidratado. Acrescido a isso, o Programa substituiu por uma fração de álcool anidro (entre 1,1% a 25%) um volume de gasolina pura consumida por uma frota superior a 10 milhões de veículos a gasolina, evitando, assim, nesse período, emissões de gás carbônico da ordem de 110 milhões de toneladas de carbono (contido no CO_2), a importação de aproximadamente 550 milhões de barris de petróleo e, ainda, proporcionando uma economia de divisas da ordem de 11,5 bilhões de dólares. (BIODIESELBR, 2006).

Finalmente, chegada à fase atual, o Brasil vive uma nova expansão dos canaviais com o objetivo de oferecer, em grande escala, o combustível alternativo, sendo que a nova escalada não é um movimento comandado pelo governo, como a ocorrida no final da década de 70, com o Pró-álcool. A corrida para ampliar unidades e construir novas usinas é movida por decisões da iniciativa privada, convicta de que o álcool terá, a partir de agora, um papel cada vez mais importante como combustível, no Brasil e no mundo (LAMONATO, 2014).

⁴Disponível no portal do novaCana: <http://www.novacana.com/etanol/aplicacoes/>, acesso em maio de 2015

No estado do Ceará, usinas produtoras de etanol estão voltando à ativa, devido à iniciativa privada, sendo essas usinas localizadas nos municípios de Barbalha e Ibiapaba (Figura 1). A meta é produzir cerca de 6 milhões de litros de etanol por ano e aumentar o consumo do biocombustível no Ceará, reduzindo o preço nos postos, além de gerar cerca de 3 mil empregos diretos e indiretos (SANTOS, 2015). Na plantação da cana-de-açúcar serão utilizadas mudas geneticamente modificadas, com o objetivo de maximizar a produção (SANTOS, 2014).

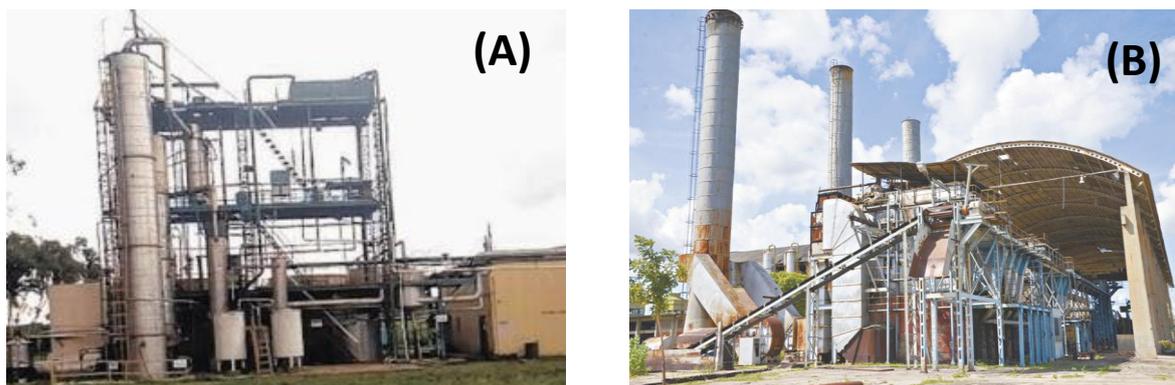


Figura 1. Usinas produtoras de etanol no estado do Ceará: Cariri II, localizada no município de Ubajara, (A) e Cariri I, localizada no município de Barbalha (B).

A produção de etanol de segunda geração (2G), através da biomassa lignocelulósica presente nos resíduos de cana-de-açúcar, está deixando a fase experimental e entrando em escala industrial de produção no Brasil (RODRIGUES, 2014). A inovação tem como impacto imediato ampliar o leque de matérias-primas empregadas na produção do álcool. As estimativas apontam que o 2G ampliará em pelo menos 20% a produção de etanol na indústria, sem a necessidade de expansão da área plantada (RYDLEWSKI, 2015). Outra expectativa é aumentar em 50% a produção de etanol apenas com o uso da palha e do bagaço da cana, sem a necessidade de ampliação de canaviais (FREITAS, 2014)

A corrida pela produção de etanol lignocelulósico no Brasil ocorre com a implantação de duas usinas produtoras. A primeira foi construída em Alagoas e recebeu o nome de Bioflex (VIEIRA, 2014). Outra usina foi implantada pela empresa Raizen e tem sua instalação em Piracicaba, no interior de SP⁵. Ambas se encontram na ativa e juntas têm capacidade de produção de 124 milhões de litros de etanol por ano, volume que será

⁵ Disponível no portal do Jornal da Cana: <http://www.jornalcana.com.br/raizen-dara-inicio-producao-de-etanol-celulosico-neste-mes/> acesso em junho de 2015

alcançado somente em 2016, e representa pouco menos de 0,5% da produção total do Brasil. Dessa forma a produção de etanol 2G no Brasil ainda está em iniciação, sendo grandes as expectativas a médio prazo, com um crescimento da demanda do produto (RYDLEWSKI, 2015).

2.2. Agroindústria do caju

Originário da América Tropical, o cajueiro pertence à família *Anacardiaceae*, que inclui árvores e arbustos tropicais e subtropicais, encontrando-se disperso numa extensa faixa compreendida entre os paralelos de 27° N, no sudeste da Flórida, e 28° S, na África do Sul (OLIVEIRA, 2008), sendo o caju (Figura 2) composto da castanha (fruto) e do pedúnculo (pseudofruto).



Figura 2. Caju (*Anacardium occidentale* L.)

O caju é cultivado atualmente em 27 países, sendo o Brasil o quarto principal produtor mundial atrás de Índia, Costa do Marfim e Vietnã⁶. Segundo dados do IBGE, a estimativa nacional para a safra de castanha de caju, no ano de 2015, é de 237.135 toneladas (TEIXEIRENSE, 2015), sendo que a produção se concentra na região nordeste (94%), com o Ceará como maior produtor com uma estimativa de produção de 165.238 toneladas de castanha numa área de 407.660 hectares (LIMA, 2013).

A cajucultura cumpre uma importante função na economia rural nordestina: a de complementar a renda do agricultor com um fluxo monetário na fase do ano na qual praticamente não existe outra produção. Geralmente, a castanha de caju representa a única fonte de recursos monetários dos agricultores de baixa renda, que destinam o restante da

⁶ Dados da FAO Statistic (2013): Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

lavouira temporária (arroz, feijão, mandioca, etc.) para o consumo, vendendo somente a castanha de caju. Trata-se, portanto, de uma cultura também adaptada às condições socioeconômicas da agricultura familiar (GUANZIROLLI, 2008).

Além disso, grande parte do pedúnculo do caju é perdida na colheita acumulando-se no solo, com aproveitamento industrial de apenas 15% do total. O pedúnculo é industrialmente processado para a produção do suco, sendo que 40% m/m de bagaço são geralmente rejeitados pela indústria local (CORREIA, 2013).

Esses fatores tornam o pedúnculo e bagaço do caju substratos ricos em nutrientes e de baixo custo (menos de R\$ 0,25/Kg) para diversas aplicações potenciais como, por exemplo, a produção de biosurfactantes (OLIVEIRA *et al*, 2010), enzimas (RODRIGUES *et al*, 2008), biogás (LEITÃO *et al*, 2011) e de etanol (ROCHA *et al*, 2011; PACHECO *et al*, 2010), uma fonte limpa e renovável de energia.

De acordo com MATIAS *et al.* (2005), o bagaço de caju (Figura 3) desidratado é constituído de açúcares totais (16,86 mg/100g) dos quais 13,32 mg/100g são açúcares redutores, proteínas (3,25%), fibras (41,53%) e lipídios (1,3%), o que o torna uma matéria-prima em potencial para diversas aplicações como a extração de carotenóides e flavonóides (BARBOSA, 2010), produção de hambúrguer de caju (LIMA, 2007) e produção de etanol (PINHEIRO *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2009; 2011; RODRIGUES *et al.*, 2010)



Figura 3. Bagaço de caju *in natura*

2.3. Produção de etanol por biomassa lignocelulósica

O processo de produção de etanol a partir do bagaço demanda a transformação da celulose e hemiceluloses em seus monômeros (glicose e xilose) e subsequente conversão dos mesmos pelos micro-organismos em bioetanol. Entretanto, a celulose nativa encontra-se muito protegida pela matriz lignocelulósica, de modo que a celulose torna-se muito recalcitrante à ação hidrolítica, resultando em processos lentos de conversão da celulose em glicose. Portanto, torna-se necessário realizar um pré-tratamento do bagaço de modo a incrementar a exposição das fibras de celulose, tornando-a mais acessível aos agentes hidrolíticos (enzimas ou ácidos).

Após o pré-tratamento, ocorre a sacarificação enzimática da biomassa vegetal, de forma a disponibilizar os açúcares fermentescíveis para, em seqüência, ocorrer a fermentação dos açúcares liberados por micro-organismos especializados. Estas etapas podem ocorrer separadamente, através do processo de Sacarificação e Fermentação Separadas (SHF), ou simultaneamente, Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF). Após isso, é realizado o processo de recuperação do etanol (processo de destilação) (HAHN-HÄGERDAL *et al.* 2006).

A lignina que é recuperada da matéria-prima pode ser utilizada no processo como fonte de energia. Atualmente, uma grande variedade de produtos químicos pode ser produzida de uma forma sustentável a partir das estruturas aromáticas da lignina (VANDERGUEM *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013).

Como diferentes materiais lignocelulósicos têm diferentes características físico-químicas, é necessário desenvolver e adotar tecnologias de pré-tratamento úteis baseadas nas propriedades da biomassa lignocelulósica de acordo com cada matéria-prima. Além disso, a escolha de determinado pré-tratamento tem um grande impacto nos passos subsequentes na conversão, como um todo, em termos de digestibilidade da celulose, geração de compostos tóxicos, potencialmente inibidores para as leveduras, energia necessária nos processos de downstream e no tratamento de água (GALBE e ZACCHI, 2007).

2.3.1. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é o recurso orgânico renovável mais abundante do planeta e possui imenso potencial de uso como matéria-prima em processos industriais para a produção de alimentos, biocombustíveis, e bens de consumo diversos. Esta biomassa inclui materiais oriundos das atividades de exploração (ROCHA *et al*, 2009).

Em geral, os materiais lignocelulósicos são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina, que se encontram associados em uma estrutura complexa definindo a estrutura da maioria dos vegetais. Proteínas, gorduras e cinzas fazem parte de uma fração do lignocelulósico. A organização e interações entre esses componentes contribuem para a formação de uma barreira natural que reduz o acesso de enzimas hidrolíticas à cadeia de celulose desses materiais (KESHWANI, 2009).

2.3.1.1. Celulose

A celulose é o material orgânico mais abundante na terra e o principal componente da parede celular da fibra vegetal. É um homopolissacarídeo linear constituído por moléculas de glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídica (Figura 2), com grau de polimerização que varia de 1000 até 50000 unidades, dependendo da origem da planta (KESHWANI, 2009). Esta unidade β -1,4-glicosídica repetitiva, conhecida como celobiose, contém seis grupos hidroxila que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermolecular. Devido a essas ligações de hidrogênio há uma forte tendência de a celulose formar cristais que a tornam completamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (SILVA *et al*, 2009).

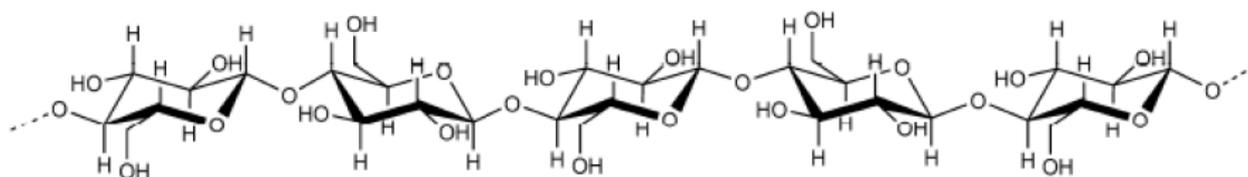


Figura 4. Estrutura da Celulose

2.3.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose, o segundo mais abundante polissacarídeo da natureza, é um heteropolímero curto formado por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (galactose, glicose e manose) e ácidos (acético, glicurônico e galacturônico). Trata-se de um material mais facilmente hidrolisado, em comparação a celulose, devido sua estrutura amorfa e ramificada (LEE *et al*, 2007). Enquanto a estrutura da celulose é constante, a hemicelulose pode variar, além da composição, sua organização estrutural. Como resultado da interação entre os diferentes açúcares, a hemicelulose apresenta baixa cristalinidade em relação à celulose, sendo mais facilmente hidrolisada (SAHA, 2003).

2.3.1.3. Lignina

A lignina é um material hidrofóbico com estrutura tridimensional bastante complexa, altamente ramificada, podendo ser classificada como um polifenol, o qual é constituído por um arranjo irregular de várias unidades de fenil propano que podem conter grupos hidroxila e metoxila como substituintes do grupo fenil, que conferem uma elevada polaridade para a macromolécula de lignina (SILVA *et al*, 2009). Esse arranjo irregular constitui o principal obstáculo à ruptura da cadeia de lignina (GOSELINK *et al.*, 2004; KESHWANI, 2009). Junto com a cadeia de hemicelulose e pectina, a lignina preenche os espaços entre as fibrilas de celulose, atuando assim como um material de ligação entre componentes da parede celular, sendo responsável pela rigidez e baixa reatividade dos materiais lignocelulósicos (D'ALMEIDA, 1988). Dessa forma, a lignina é o constituinte dos lignocelulósicos que negativamente influencia a hidrólise enzimática da celulose. Contudo diferentes aplicações da lignina estão em investigação para obtenção de produtos com potencial de mercado (ALVIRA *et al.*, 2010).

2.3.2. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

De acordo com GALBE e ZACCHI (2007), para um pré-tratamento ser considerado efetivo, deve apresentar algumas características como: resultar em alta extração de açúcares; permitir alta digestibilidade da celulose, no caso de subsequente hidrólise enzimática; produzir quantidades insignificantes de produtos de degradação derivados dos açúcares ou da lignina, que serão tóxicos aos micro-organismos; ter uma baixa demanda energética ou ser realizado em uma via que possibilite o reuso da energia em outras etapas

do processo como calor secundário; ter um baixo custo de capital e operacional. Vários métodos de pré-tratamento de biomassas vegetais lignocelulósicas têm sido sugeridos ao longo das duas últimas décadas. Cada categoria de pré-tratamento apresenta particularidades para a aplicação em larga escala. Os físicos, embora simples, apresentam elevado custo energético. Os pré-tratamentos físico-químicos são eficientes, mas a produção de inibidores nesse processo é elevada. O que também ocorre com os pré-tratamentos químicos. Os biológicos são desinteressantes para aplicação comercial devido ao elevado tempo de processo (ALVIRA *et al.*, 2010).

2.3.2.1. *Pré-tratamento ácido-álcali*

O principal objetivo do pré-tratamento ácido é a solubilização da fração hemicelulósica da biomassa com a finalidade de tornar a celulose mais acessível à hidrólise enzimática, sendo utilizado ácido concentrado ou diluído (ALVIRA *et al.*, 2010).

A utilização de ácido concentrado possui a vantagem de não utilização de enzimas para sacarificação, mas possui as desvantagens de apresentar um elevado consumo de energia, corrosão dos equipamentos, e maior tempo de reação, bem como a obrigação de recuperação do ácido após o tratamento que, tende a limitar a sua aplicabilidade (GALBE e ZACCHI, 2002; SUN e CHENG, 2002). Com isso, o uso de ácido diluído pode ser considerado o método mais apropriado para o uso industrial por ser aplicável a uma grande variedade de lignocelulósicos (ALVIRA *et al.*, 2010).

Durante o pré-tratamento com ácido diluído, as frações de celulose e lignina podem permanecer quase inalteradas na fase sólida. Dependendo das condições operacionais, na fase líquida dos hidrolisados serão constituídos por monossacarídeos (xilose, glicose e arabinose), produtos de decomposição das hemiceluloses (formação de ácido acético a partir da hidrólise de grupos acetil) e/ou o produtos de decomposição dos monossacarídeos (tais como o furfural, produto da degradação das pentoses, e 5-hidroximetilfurfural, produto da degradação das hexoses) (GÁMEZ *et al.*, 2006; CARDONA *et al.*, 2010).

Com isso, o pré-tratamento com ácido diluído tem-se mostrado como eficiente para solubilizar e hidrolisar a hemicelulose em açúcares monômeros e oligômeros solúveis, removendo-os das fibras de celulose (LU *et al.*, 2007), sendo o ácido mais utilizado o ácido sulfúrico (H₂SO₄) devido ao baixo custo e eficiência em torno de 90% de solubilização da hemicelulose (WYMAN *et al.*, 2005).

Em relação ao pré-tratamento álcali, um dos principais efeitos nos materiais lignocelulósicos consiste na ruptura das ligações de hidrogênio intermoleculares entre as cadeias de xilanas e de outros componentes da biomassa, tais como a lignina ou outra cadeia hemicelulósica, resultando no aumento da porosidade do material. Além disso, o uso do álcali em solução geralmente promove uma expansão da parede celular do material aumentando a área superficial da matriz do lignocelulósico. Esses efeitos favorecem a ação das enzimas na etapa de hidrólise enzimática (HAQUE *et al.*, 2013).

A presença da lignina restringe o acesso da enzima celulase à celulose, impedindo a sacarificação (MUSSATO *et al.*, 2008). Na literatura, muitos são os trabalhos sobre a influência do pré-tratamento alcalino na solubilização da lignina, considerada uma etapa fundamental no pré-tratamento de lignocelulósicos (RUZENE *et al.*, 2008; MCINTOSH; VANCOV, 2010; LI *et al.*, 2012).

O pré-tratamento alcalino é capaz de aumentar a hidrólise enzimática da celulose, pois as bases são eficientes na solubilização da lignina, mantendo as cadeias de celulose e hemicelulose quase intactas quando comparado aos pré-tratamentos com ácidos ou hidrotérmicos (CARVALHEIRO *et al.*, 2008).

A utilização do hidróxido de sódio (NaOH) provoca intumescimento no material com o aumento da superfície da celulose, reduzindo seu grau de polimerização e cristalinidade, favorecendo a ruptura da estrutura da lignina. Esse é capaz de aumentar a digestibilidade de alguns materiais lignocelulósicos de 14% a 55%, reduzindo o percentual de lignina de 24–55% para 20% (TAHERZADEH e KARIMI, 2008; KUMAR e WYMAN, 2009; ALVIRA *et al.*, 2010).

Outra importante função dos álcalis após o pré-tratamento dos lignocelulósicos é a possibilidade de remoção de inibidores formados em decorrência da degradação dos açúcares. Estes subprodutos incluem ácidos alifáticos, furaldeídos e compostos fenólicos (furfural e hidroximetilfurfural) que estão contidos do hidrolisado que posteriormente inibiriam o crescimento microbiano e a formação de etanol durante a fermentação (PERSSON *et al.*, 2002).

Os pré-tratamentos ácido (com H₂SO₄ diluído), seguido de álcali (com NaOH), têm sido utilizados em seqüência em estudos reportados na literatura no tratamento do bagaço do pedúnculo do caju (ROCHA *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2014), de cana-de-açúcar (GUILHERME, 2014), de resíduos de espiga do milho (ZHANG *et al.*, 2010), de palha do milho (LEE *et al.*, 2015b), de resíduos de banana (GABHANE *et al.*, 2014), e de resíduos do

fruto da palmeira (KIM *et al*, 2012) de forma a utilizar as funcionalidades de cada tecnologia para permitir a melhor solubilização da hemicelulose, deslignificação e concentração da celulose, além da deslignificação da biomassa.

ROCHA (2010), estudando pré-tratamento para a produção de etanol a partir do bagaço do pedúnculo do caju, avaliou as condições operacionais do pré-tratamento ácido (H_2SO_4), e a necessidade do pré-tratamento alcalino (NaOH 4% m/V por 30 minutos) realizado em sequência, ambos os pré-tratamentos foram conduzidos a 121 °C. Foi concluído que o pré-tratamento ácido deveria ser realizado com concentração de H_2SO_4 de 0,6 M, com carga de sólidos de 30 % m/V e tempo de 15 minutos. A utilização do pré-tratamento alcalino, em conjunto com o ácido, conduziu a um maior rendimento em etanol em relação a quantidade total de bagaço pré-tratado ($0,12 \frac{g_{etanol}}{g_{bagaço}}$), do que quando o bagaço foi pré-tratado somente com ácido ($0,6 \frac{g_{etanol}}{g_{bagaço}}$), de forma que o bagaço pré-tratado com ácido, seguido de álcali é uma alternativa promissora para produção de etanol de segunda geração.

RODRIGUES (2014) realizou pré-tratamento do bagaço do pedúnculo do caju com ácido (H_2SO_4 com concentração de 0,6 M), seguido de álcali (NaOH com concentração de 1M), em temperatura de 121 °C para ambos os processos. Com o pré-tratamento ácido foi obtida uma solubilização de parte da hemicelulose presente do bagaço *in natura* pela redução do seu percentual de 16,33% para 3,72% no bagaço pré-tratado, resultando no acúmulo de celulose de 25,37% e de 56,70% de lignina. Já o pré-tratamento alcalino proporcionou um aumento na porcentagem de celulose de 20,91% para 71,93%, correspondendo a um enriquecimento de celulose de 244%. Dessa forma, o pré-tratamento ácido-álcali tem se mostrado eficiente para a solubilização da hemicelulose e deslignificação do bagaço do pedúnculo do caju.

2.3.2.2. *Hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos*

Após a etapa de pré-tratamento, é necessária uma etapa de hidrólise (ou sacarificação) da celulose para a disponibilização de açúcares fermentescíveis como glicose e xilose (CORREIA, 2013).

A hidrólise enzimática, realizada através de enzimas celulolíticas ou celulasas, é um processo muito estudado por apresentar especificidade de reação, ausência de reações

secundárias (prejudiciais ao rendimento), e reação em condições que não requerem altas pressões e temperaturas ou ambientes corrosivos para os equipamentos (BASTOS, 2007).

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol (HENRISSAT, 1991).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações *O*-glicosídicas, e a sua classificação está de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, dividindo-as em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis como a celobiose, em glicose (LYND *et al*, 2002).

A endoglucanase (EnG) é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise, a qual atua hidrolisando randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando diversos oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (KLEMAN-LEYER, 1996).

O grupo das exoglucanases (ExG) é constituído por celobiohidrolases (CBH) e glucano-hidrolases (GH). A GH (1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolase), apesar de pouco reportada, possui estratégia de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero. A CBH (1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase) participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogênese, que apesar de ser um fenômeno ainda não completamente elucidado, sabe-se que envolve uma ruptura física do bagaço, causando uma desestratificação das fibras, através do aumento de regiões intersticiais. Esta amorfogênese promove um aumento na taxa de hidrólise da celulose, por tornar o substrato mais exposto à ação das celulases, já que ocorre uma amorfização das regiões cristalinas do polímero (ZHANG *et al*, 2004). A CBH pode ser dividida em dois tipos CBH-I (hidrolisa terminais redutores) e CBH-II (hidrolisa terminais não-redutores), sendo que ambas podem sofrer inibição pelo seu produto de hidrólise: a celobiose (AWAFO, 1997).

O terceiro grupo inclui a enzima β -glicosidase (BG). Essa enzima tem a propriedade de hidrolisar a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND *et al*,

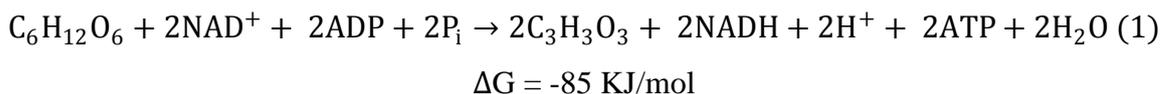
2002). A deficiência ou ausência desse terceiro grupo de enzimas pode causar uma inibição das enzimas CBH, prejudicando a ação sinérgica das enzimas do complexo e o rendimento da hidrólise enzimática (AWAFO, 1997). Isso ocorre porque as enzimas celulolíticas, quando atuam conjuntamente, possuem um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, sendo esse efeito conhecido como sinergia (BHAT *et al*, 1997).

Atualmente, a biomassa lignocelulósica, de diversas fontes, tem sido hidrolisada para a produção de etanol de segunda geração como: bagaço do pedúnculo do caju (ROCHA, 2010; CORREIA, 2013; RODRIGUES, 2014), bagaço da cana-de-açúcar (CARVALHO *et al*, 2013; GUILHERME, 2014), palha de arroz (OBEROI *et al*, 2012; CUNHA *et al*, 2014), madeira de coníferas do gênero *Picea* (HOYER *et al*, 2013), resíduos de milho (LIU *et al*, 2010), palha de trigo (PAULOVÁ *et al*, 2014) e grama de *Panicumvirgatum* (PESSANI *et al*, 2011).

2.3.2.3. Fermentação alcoólica

A fermentação é o termo geral para a degradação anaeróbia da glicose (glicólise) ou de outro nutriente orgânico para obter energia química, armazenada na forma de ATP, sendo, provavelmente, o mecanismo biológico mais antigo para a obtenção de energia de moléculas orgânicas (LEHNINGER *et al*, 2013).

A glicólise corresponde a um processo que ocorre em 10 etapas, catalisadas por enzimas, no qual, a partir de uma molécula de glicose (seis carbonos), ocorre a produção de duas moléculas de piruvato, ou ácido pirúvico (três carbonos). Nessa reação (Equação 1), para cada molécula de glicose gasta são produzidas duas de ATP, a partir de ADP e P_i (grupo fosfato), sendo esse o rendimento líquido da reação, a qual é irreversível, de acordo com a energia livre de Gibbs líquida negativa (LEHNINGER *et al*, 2013).



Em condições anaeróbias a molécula de piruvato é descarboxilada pela enzima piruvato descarboxilase para gerar acetaldeído e gás carbônico. O aldeído, em seguida, é reduzido em uma reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase para produzir etanol

(C₂H₅OH) (Figura 5). Esse processo ocorre em micro-organismos como leveduras e bactérias, e é conhecido como fermentação alcoólica (BERG *et al*, 2012).

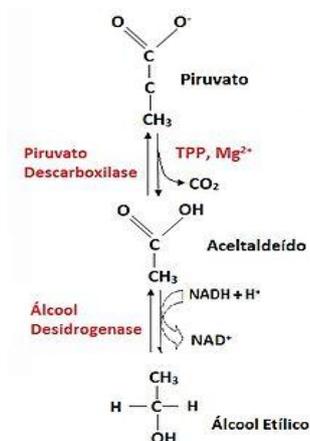
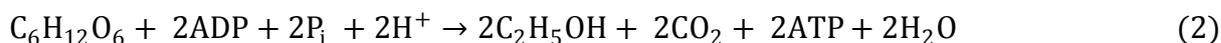


Figura 5. Transformação bioquímica do piruvato a etanol.

Com isso, é obtida a equação global da fermentação alcoólica:

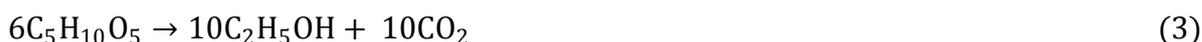


É possível notar que não há NAD^+ nem NADH na Equação 2, isso ocorre porque a mesma é a equação global do processo de conversão de glicose em etanol, e nessa taxa de oxidação-redução líquida é igual a zero (BERG *et al*, 2012). O rendimento teórico da conversão de glicose em etanol é de 0,511 g_{etanol}/g_{glicose} (PINHEIRO, 2011). Na prática, este valor não é observado devido à utilização de parte dos carboidratos fermentáveis para a produção de glicerol, alcoóis superiores, ácidos, entre outras substâncias necessárias para a síntese de material celular e manutenção fisiológica da levedura (GUILHERME, 2014)

A glicose, oriunda da hidrólise da celulose, a qual é uma hexose (carboidrato com seis átomos de carbono) é o açúcar mais comum utilizado por micro-organismos como combustível para a produção de etanol (BERG *et al*, 2012), no entanto o metabolismo de certos micro-organismos também permite a assimilação de pentoses (carboidratos com cinco átomos de carbono), como xilose e arabinose, oriundos da hidrólise da hemicelulose, para a produção de etanol (OLSSON, 1996; CORREIA, 2013), sendo a xilose o segundo açúcar fermentável mais presente em hidrolisados (MATSUSHIKA *et al*, 2009).

O mecanismo de fermentação da xilose para a produção de etanol foi descrito por MATSUSHIKA *et al* (2009), onde os autores descreveram mecanismos diferentes para bactérias e fungos. Em ambos os mecanismos a D-xilose é transformada em D-xilulose, sendo que para fungos a D-xilose é inicialmente reduzida a xilitol pela ação da xilose-redutase, e o xilitol é oxidado à D-xilulose com o auxílio da enzima xilitol desidrogenase, já em bactérias o D-xilitol é diretamente transformado em D-xilulose através da enzima xilose isomerase. O restante de ambos os mecanismos são similares: D-xilulose é fosforilada pela enzima xilulokinase à D-xilulose-5-fosfato, o qual é metabolizado na via das pentoses-fostato não-oxidativa (PPP⁷), para ser introduzido na glicólise e, em seguida, para a produção de etanol (MATSUSHIKA *et al*, 2008).

De acordo com KOTTER *et al* (1993), a equação que descreve o balanço de massa da fermentação anaeróbia da xilose é:



Dessa forma o rendimento teórico em etanol é de 0,51 g_{etanol}/g_{xilose}, similar ao rendimento teórico quando o substrato utilizado é a glicose.

2.3.2.4. *Micro-organismos produtores de etanol*

As leveduras são os micro-organismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Trata-se de um organismo vivo, com múltiplas habilidades metabólicas, podendo alterar a estequiometria da fermentação em resposta a alterações no meio, com grande impacto no rendimento do processo (BARROS, 2013). A levedura é um microrganismo facultativo, que em aerobiose transforma parte do açúcar em biomassa, CO₂ e água. Já em anaerobiose, converte os açúcares em etanol e CO₂(LIMA *et al.*, 2001).

Dentre as leveduras utilizadas em bioprocessos, *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada para a produção de bebidas e etanol, embora existam outros gêneros de potencial aplicação em processos biotecnológicos (PACHECO, 2010).

⁷ Em inglês: “*Pentose Phosphate Pathway*”

Cepas pertencentes às espécies e gêneros da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem a capacidade de assimilar hexoses (como a glicose) para a produção de etanol, porém é reportada na literatura a incapacidade dessas leveduras de metabolizar a xilose para a produção de etanol, devido à ausência da enzima xilulase nas mesmas, não sendo possível converter xilose na xilulose, apesar da capacidade dessa levedura de fermentar a xilulose (KÖTTER *et al.*, 1993; BALAT, 2011).

Dessa forma, estudos com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para a produção de etanol a partir da xilose têm sido reportados na literatura (KÖTTER *et al.*, 1993; HO *et al.*, 1998; MATSUSHIKA *et al.*, 2008; MATSUSHIKA *et al.*, 2009). No entanto, existem espécies nativas de leveduras que fermentam xilose em etanol, incluindo *Pichia* várias espécies de *Candida*, bem como algumas cepas de *Kluyveromyces marxianus* (YABLOCHKOVA *et al.*, 2003; YABLOCHKOVA *et al.*, 2004).

Cepas pertencentes às espécies e gênero da levedura *Kluyveromyces marxianus* têm sido isoladas e estudadas para diferentes aplicações biotecnológicas. Dentre os estudos utilizando esta levedura inclui-se a produção de enzimas (β -galactosidase, β -glicosidase, entre outras), compostos aromáticos e etanol (BOYLE *et al.*, 1997; WILKINS *et al.*, 2008) redução do teor de lactose em alimentos (BRADY *et al.*, 1997; MARTINS *et al.*, 2002), além de aplicações em biorremediação e na medicina (FONSECA *et al.*, 2008). *K. marxianus* é uma das leveduras mais promissoras para aplicações biotecnológicas, já que suporta altas temperaturas e mostra tolerância moderada ao etanol (PEJO *et al.*, 2009).

As leveduras sofrem um efeito de regulação do metabolismo, dependendo da concentração de substrato presente no meio, chamado de “Efeito Crabtree” ou “Contre-effet Pasteur”. Para leveduras que sofrem a ação desse efeito (Crabtree positivas), quando estão submetidas a elevadas concentrações de glicose, ocorre a repressão do efeito Pasteur (inibição da atividade fermentativa pela respiração), favorecendo, desse modo, a fermentação alcoólica (DEKEN, 1966). Diferente de *S. cerevisiae*, que é classificada como Crabtree positiva, linhagens de *K. lactise* *K. marxianus* são geralmente classificadas como Crabtree negativa (FONSECA *et al.*, 2008), sendo que, em elevadas concentrações de glicose, o efeito Pasteur é favorecido e a atividade fermentativa é reprimida pela respiração (DEKEN, 1966).

Nesse sentido, devido às características destas cepas, estudos de processos de produção de etanol de segunda geração por sacarificação e fermentação simultâneas, utilizando *Kluyveromyces marxianus*, têm sido reportados na literatura (KRISHNA *et al.*, 2001; BALLESTEROS *et al.*, 2004; OBEROI *et al.*, 2012; CORREIA, 2013; RODRIGUES, 2014).

Nos estudos de RODRIGUES (2014), a cepa de *Kluyveromycesmarxianus* ATCC36907 foi apresentada como promissora, pois apresentou potencial de fermentação próximo ao de uma levedura do gênero de *Saccharomyces*, com elevado crescimento celular e produção de etanol em temperaturas mais elevadas, sendo o seu potencial avaliado em processos de sacarificação e fermentação simultâneas. CORREIA (2013), em seu trabalho de produção de etanol a partir de bagaço de caju pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, também utilizou *Kluyveromycesmarxianus* ATCC36907 para sacarificação e fermentação simultâneas à 45°C e obteve uma conversão de celulose de aproximadamente 98%, reforçando, assim, a utilização dessa cepa para a produção de etanol por processos de sacarificação e fermentação simultâneas.

Também, estudos de processos em batelada alimentada têm sido reportados em conjunto com processos SSF, de forma a eliminar efeitos inibitórios atrelados a processos em batelada (BALLESTEROS *et al*, 2002; RUDOLF, 2005; PEJO *et al*, 2009; LIU *et al*, 2010; PESSANI *et al*, 2011; PAULOVÁ *et al*, 2014). Dessa forma o potencial de cepas de *Kluyveromycesmarxianus* deve ser investigado para a produção de etanol de segunda geração.

2.3.3. Estratégias para produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica

2.3.3.1. Estratégias para produção de etanol em batelada

Na produção de etanol de segunda geração, diferentes configurações de processos podem ser definidas de acordo com a integração das etapas de hidrólise enzimática (sacarificação da biomassa) e fermentação.

No processo de Sacarificação e Fermentação Separadas (SHF), o sólido resultante do pré-tratamento após ser submetido às etapas posteriores de lavagem para remoção dos inibidores, é conduzido à etapa de hidrólise enzimática pela adição de enzimas celulolíticas. O hidrolisado resultante é convertido em etanol por leveduras de fermentação convencionais ou outros micro-organismos em potencial. Nesse caso, os processos de hidrólise e fermentação podem ocorrer em temperaturas distintas e favoráveis para cada processo, 45-50 °C para hidrólise e cerca de 30-32 °C para fermentação (BRETHAUTER e WYMAN, 2010), que é a vantagem desse processo, pois cada processo pode ocorrer nas suas condições operacionais ótimas (DAHNUM *etal*, 2015). O fluxograma desse processo pode ser visualizado através do diagrama de blocos na Figura 6.

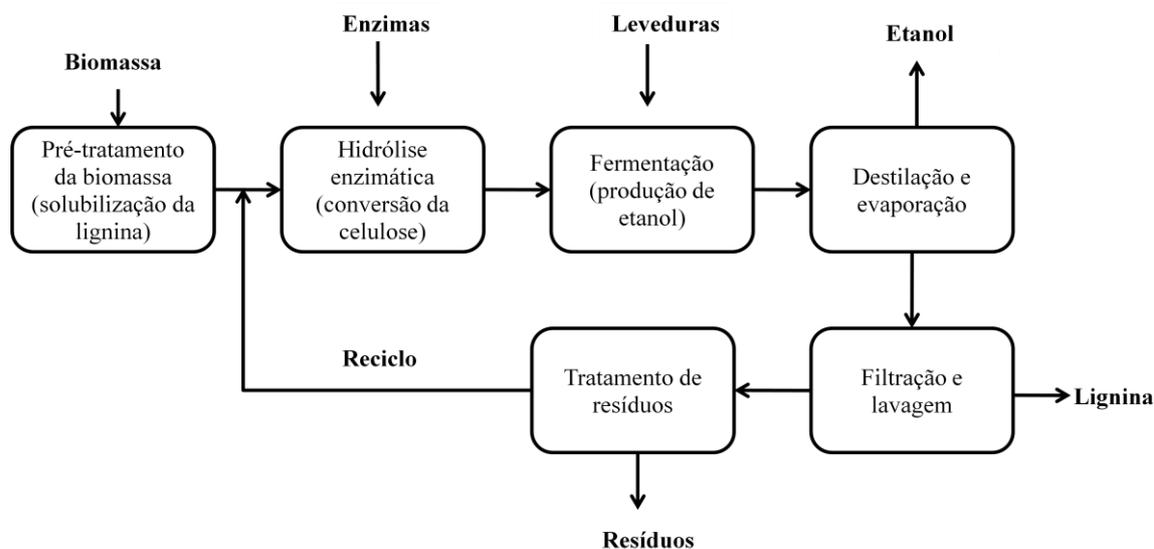


Figura 6. Diagrama de blocos para o processo de transformação da biomassa lignocelulósica em etanol através de hidrólise e fermentação separadas (SHF).

Na Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF), a hidrólise e a fermentação ocorrem simultaneamente no mesmo reator. O fluxograma desse processo pode ser visualizado através do diagrama de blocos na Figura 7. A maior vantagem da SSF é que os açúcares liberados durante a hidrólise enzimática são imediatamente consumidos pelos micro-organismos envolvidos na fermentação, o que conseqüentemente diminui a concentração de produtos inibidores das enzimas (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006). Esta tecnologia tem sido melhorada de modo a incluir a co-fermentação de substratos com múltiplos açúcares, ou seja, a sacarificação simultânea de celulose (em glicose), e de hemicelulose (em xilose), e co-fermentação da glicose e xilose, por micróbios geneticamente modificados presentes no mesmo meio (LEE *et al.*, 2013).

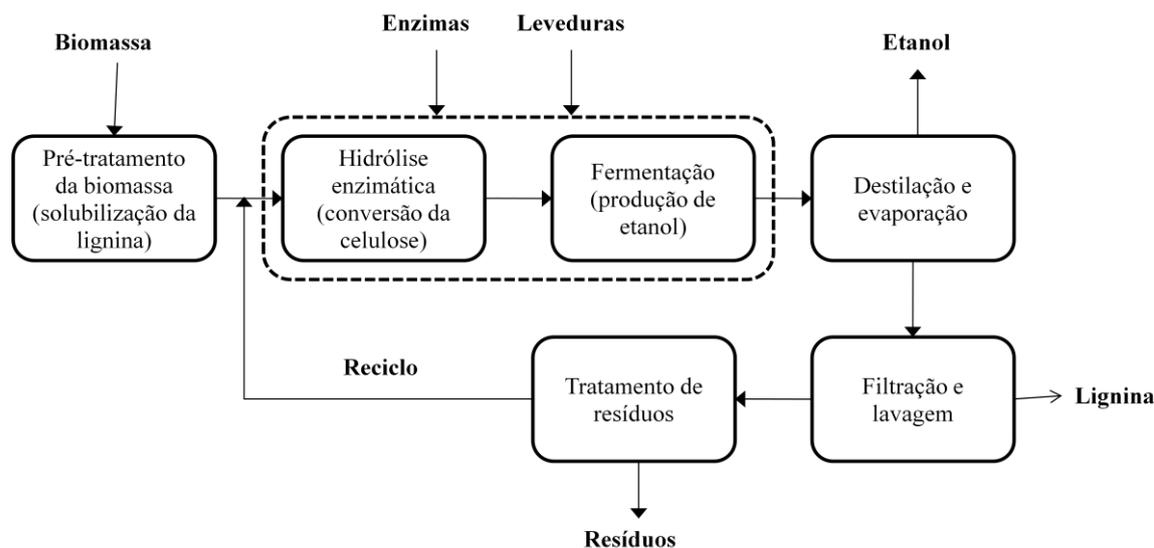


Figura 7. Diagrama de blocos para a transformação da biomassa lignocelulósica em etanol através de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).

RODRIGUES (2014) estudou a produção de etanol a partir de processos SHF e SSF do bagaço do pedúnculo do cajupré-tratado com ácido-álcali, utilizando *Kluyveromycesmarxianus* ATCC36907. Em processo SHF, realizado com enzimas do complexo Celluclast 1.5L a 60 FPU/g_{celulose}, hidrólise à 45 °C e fermentação à 40 °C, a autora obteve um rendimento de 0,43 g_{etanol}/g_{glicose}, sendo essa temperatura (40 °C) a selecionada para processos SSF. Realizando SSF da mesma biomassa lignocelulósica à 40 °C, utilizando celulases NS 22074 a 30 FPU/g_{celulose}, foi obtido um rendimento 0,49 g_{etanol}/g_{glicose} e uma eficiência de processo de 95,6%, demonstrando o potencial do processo SSF.

DAHNUM *et al* (2015) compararam processos SHF e SSF de resíduos do fruto da palmeira com *Saccharomycescerevisiae*. Os autores concluíram que o processo simultâneo (SSF) possui vantagens frente ao SHF, pois todo o processo ocorre a uma temperatura menor (menor gasto energético), como a produção de etanol ocorre com menor tempo, já que os processos de hidrólise e fermentação são simultâneos. No processo SSF com 40 FPU/g_{celulose} os autores encontraram uma produção máxima de etanol de 6,05% V_{etanol}/V_{solução}, equivalendo a um rendimento teórico de 97% com 24 horas de processo, contra 4,72% de etanol e um rendimento teórico de 76% em processo SHF com 72 horas de fermentação, demonstrando a efetividade do processo SSF em detrimento do processo SHF.

Outra alternativa de estratégia de processo, que visa otimizar a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), é a utilização de uma etapa de pré-hidrólise antes de iniciar a sacarificação e fermentação simultâneas, sendo o processo denominado PSSF (Figura 8).

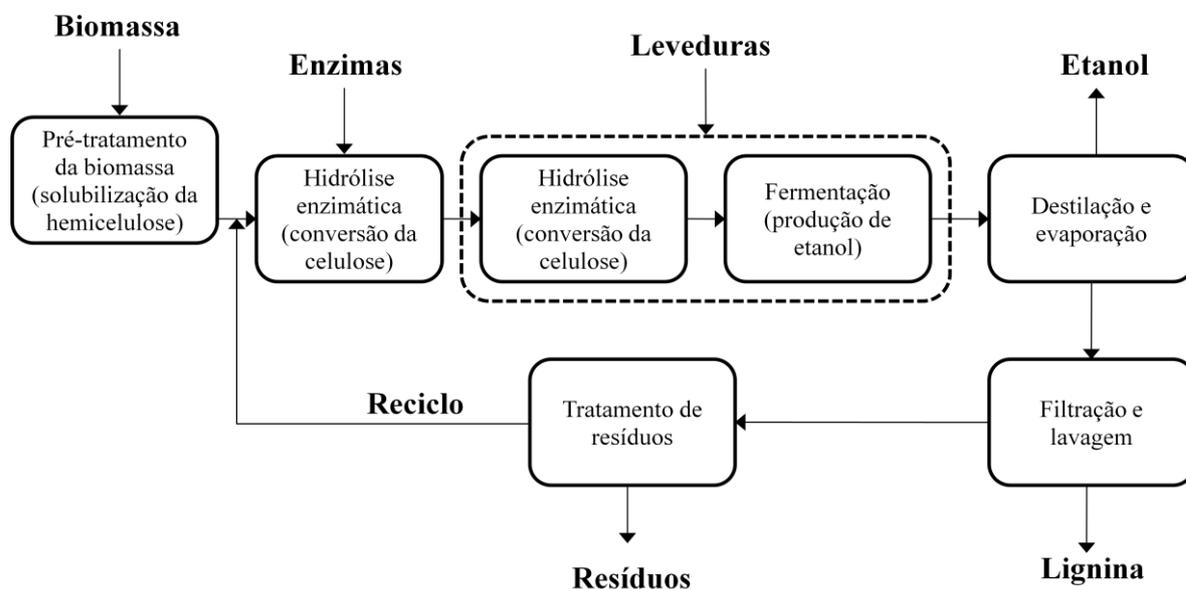


Figura 8. Diagrama de blocos da transformação da biomassa lignocelulósica em etanol através de sacarificação e fermentação simultâneas com pré-sacarificação (PSSF).

O objetivo do pré-hidrólise é hidrolisar parcialmente a celulose em açúcares monoméricos e oligoméricos antes da adição de levedura, o que aumentaria a taxa de produção de etanol durante a parte inicial da SSF. Essa técnica busca potencializar a hidrólise enzimática inicial, pois, como ainda não foram adicionadas leveduras, a mesma poderia ser executada em uma temperatura diferente, mais próxima da atividade hidrolítica ideal (ÖGREN *et al*, 2007).

Outra característica importante é que uma pré-hidrólise enzimática do material lignocelulósico diminui a viscosidade do caldo fazendo as substâncias insolúveis em água se tornarem solúveis, permitindo mais fácil bombeamento e agitação. A diminuição da viscosidade durante a pré-hidrólise torna possível a sacarificação e fermentação simultâneas mesmo com muito alta concentração de sólidos insolúveis no início da pré-hidrólise (ÖGREN *et al*, 2007; HOYER *et al*, 2013).

ÖGREN *et al* (2007) estudaram processos PSSF (sacarificação e fermentação simultâneas com pré-sacarificação). Os autores realizaram estudos com diferentes complexos enzimáticos e utilizaram a temperatura de hidrólise enzimática ideal

para cada um dos complexos: 48°C para o complexo Celluclast 1.5L, suplementado com uma preparação de β -glicosidade (Novozymes) e 55°C para o complexo termo-ativo, constituído de celobiohidrolases, endoglucanases, β -glicosidades e xilanases, desenvolvido por RoalOy na Finlândia. O tempo de pré-sacarificação foi de 16 horas e depois desse tempo a temperatura foi diminuída para 35°C para o início do processo SSF, sendo que o processo com pré-sacarificação e sem pré-sacarificação foi testado para cada complexo enzimático. Os resultados mostraram que, apesar de ter apresentado maior produtividade (medida com 24 horas para todos os processos), os processos PSSF não aumentaram as produções máximas de etanol em relação aos processos SSF. Os autores concluíram que a pré-hidrólise não influenciou positiva ou negativamente no rendimento da fermentação alcoólica. No entanto, devido ao rápido e decréscimo significativo da viscosidade, a pré-hidrólise pode ter grande impacto, se for necessário para bombear ou agita-se a suspensão antes SSF.

HOYER *et al* (2013), realizando uma sacarificação e fermentação simultâneas de madeira de uma conífera, observaram que a adição de uma etapa de pré-hidrólise de 22 horas elevou a eficiência de processo para 72%. Porém, DEVANTIER *et al* (2005) afirmaram em seu trabalho que muitas plantas industriais de produção de etanol apresentam a etapa de pré-hidrólise mas que essa não é desejada, já que aumenta risco de contaminação do processo. Dessa forma, a presença ou não da etapa de pré-hidrólise deve ser avaliada em um processo de sacarificação e fermentação simultâneas.

2.3.3.2. *Estratégias de produção de etanol em batelada alimentada*

Os processos em batelada alimentada têm-se mostrado eficientes e versáteis na grande maioria dos processos fermentativos, inclusive nos de fermentação alcoólica. Este processo apresenta grande flexibilidade de operação, por permitir a utilização dos fermentadores para a fabricação de diferentes produtos, pela possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, pelo controle mais estreito da estabilidade genética do micro-organismo e pela capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto (BORGES, 2008).

A Figura 9 apresenta o fluxograma de processo de Sacarificação Fermentação Simultâneas (SSF) em batelada alimentada para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica.

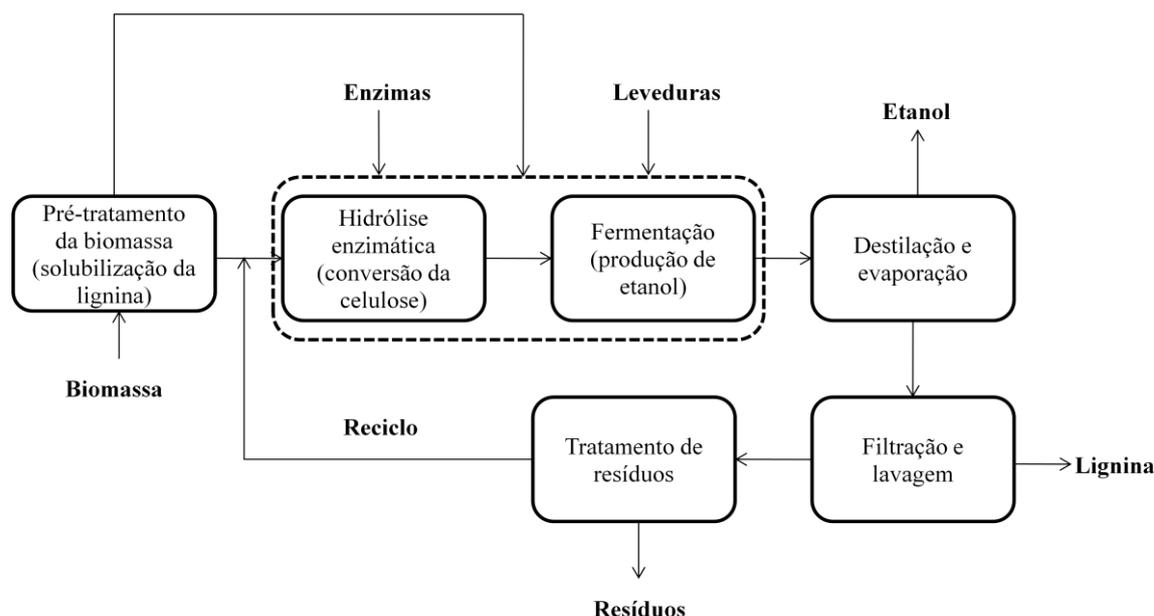


Figura 9. Fluxograma de processo de Sacarificação Fermentação Simultânea (SSF) em batelada alimentada para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica.

O estudo de estratégias de alimentação gradual de substrato, em conjunto com processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), com o objetivo de aumentar a concentração de etanol no caldo fermentado e, ao mesmo tempo, eliminar problemas relacionados à inibição da atividade enzimática e/ou fermentativa, devido a elevadas concentrações de substrato, produto e inibidores nos processos em batelada têm sido reportados na literatura (PAULOVÁ *et al*, 2014; PESSANI *et al*, 2011; YANG *et al*, 2010; ZHANG *et al*, 2010; LIU *et al*, 2010; RUDOLF *et al*, 2005). A alimentação de substrato pode ocorrer com ou sem dosagem enzimática, ao longo do processo SSF.

LIU *et al* (2010) descreveram no seu trabalho que uma elevada concentração inicial de substrato no meio de sacarificação e fermentação simultâneas pode interferir negativamente na hidrólise da celulose, devido à problemas com a transferência de massa, e que são necessárias estratégias de alimentação de substrato de forma a prevenir inibições inerentes ao processo, tanto pelo substrato como pelo produto. Esses autores realizaram estudos de produção de etanol em batelada alimentada a partir de resíduos de caroço de milho, comparando a eficiência do mesmo com dados da literatura em batelada. Foram realizadas várias estratégias de alimentação partindo de 6% de sólidos e atingindo 9,9; 11,3; 12,4; 13,4; 14,2; 15,0 de porcentagem total de sólidos secos, sendo dosada celulase durante as alimentações. O autor obteve, com a carga total de 15%, a maior concentração de etanol (57,2 g/L) e conversão de celulose teórica de 85%.

ZHANG *et al* (2010) realizou a produção de etanol a partir de processos em batelada alimentada, em conjunto com SSF, a partir de caroço de milho pré-tratado com ácido (H_2SO_4), seguido de pré-tratamento básico (NaOH). Os experimentos em batelada alimentada foram iniciados com 19% de carga de sólidos, sendo que outros 6% foram adicionados em 3, 6 e 12 porções durante as primeiras 24 horas, atingindo um total de 25% de sólidos. A dosagem inicial de enzimas foi de $30 \text{ FPU.gcelulose}^{-1}$, sendo que ocorreram também alimentações enzimáticas com dosagem de $22,8 \text{ FPU.gglucanos}^{-1}$. Os processos SSF duraram 96 horas. Os autores descrevem que foi alcançada uma produção máxima de etanol de 84 g/L, correspondendo a um rendimento em etanol de 79,6%, sendo isso equivalente à estratégia de 6 adições de substrato, sendo uma adição a cada 4 horas. Essa produção de etanol foi superior ao máximo rendimento do processo em batelada com pré-sacarificação (69 g/L).

PESSANI *et al* (2011) realizaram estudos de produção de etanol de segunda geração através de sacarificação e fermentação simultâneas da palha de *Panicumvirgatum*, uma árvore nativa da América do Norte, utilizando *Kluyveromycesmarxianus*. Os autores realizaram quatro estudos, sendo um deles em batelada e outros três em batelada alimentada, com alimentação de sólidos e enzimas. No estudo A ele realizou estudo em batelada com 12% de sólidos e um volume enzimático equivalente à quantidade de celulose presente nesses sólidos. No estudo B, ele realizou o estudo em batelada alimentada com carga inicial de 8% com a quantidade de enzimas equivalente à 12% e, depois de 12 horas, adicionou 4% de sólidos sem adição de enzimas. No estudo C, ele adicionou 8% de sólidos como carga inicial e a quantidade de enzimas equivalente a esses 8% e, depois de 12 horas, adicionou os 4% de sólidos com a quantidade de enzimas equivalente aos 4% restante de sólidos. No estudo D o autor adicionou 8% de carga inicial de sólidos e a quantidade de enzimas equivalente a esses 8% e, depois de 12 horas, adicionou os 4% restantes sem adição de enzimas, sendo que esse processo apresentou 33% a menos de enzimas do que os outros. Nesse estudo foi concluído que, apesar de a produção de etanol ter sido maior para o processo em batelada (com uma eficiência de produção de etanol de 86%), o processo em batelada alimentada que possuiu uma menor quantidade de enzimas utilizadas (33% a menos) possuiu um rendimento de 82%, e similar aos outros processos semi-contínuos no mesmo estudo.

Os resultados do trabalho de PESSANI *et al* (2011) ajudam a concluir que a adição de enzimas somente no início do processo de sacarificação e fermentação simultâneas em batelada alimentada e com volume equivalente à quantidade inicial de sólidos já presentes

inicialmente no meio, sem adições durante as alimentações, não influenciou negativamente na eficiência do processo, além de permitir uma economia no custo do processo SSF.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Micro-organismo

Foi utilizada, no presente estudo, a cepa de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, obtida de uma coleção de culturas norte-americana e adquirida com recursos de projeto.

3.2. Material lignocelulósico

O bagaço de caju utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pela Indústria de Processamento de Sucos do Brasil situada no estado do Ceará, Brasil. A matéria-prima doada foi estocada em freezer na temperatura -10°C até seu uso.

3.3. Tratamento primário da matéria lignocelulósica

O bagaço de caju (CAB) inicialmente foi lavado com água na proporção de 1 fibra:2 água, procedimento realizado cinco vezes para retirada de suco residual, pigmentos e antioxidantes.

Posteriormente, o bagaço de caju foi seco a 50-60°C em estufa com circulação de ar, triturado com liquidificador, peneirado e estocado até seu uso. Após peneiramento do material, as partículas com diâmetro de 0,25-0,84 mm foram estocadas em temperatura ambiente e utilizadas como matéria-prima para a realização dos experimentos.

3.4. Pré-tratamento do material lignocelulósico

O material lignocelulósico, após o tratamento primário (CAB_T), foi submetido a um pré-tratamento ácido seguido de álcali de acordo com a metodologia descrita por ROCHA *et al* (2009).

O pré-tratamento ácido do bagaço de caju consistiu na imersão do bagaço seco em solução de H₂SO₄ 0,6 M; mantendo a concentração de sólidos de 30g/L, procedimento realizado em frascos erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente, os frascos foram para autoclave

para o tratamento térmico a 121°C durante 15 minutos. Após o pré-tratamento, a fração sólida foi separada da líquida por filtração à vácuo. A fração sólida resultante foi submetida a três lavagens com H₂O destilada para remoção do excesso de ácido na proporção material úmido/água 1:2. Em seguida, o material foi seco a 50°C por 24 horas, triturado e estocado até seu uso. O material seco foi nomeado CAB-H.

O bagaço de caju pré-tratado CAB-H foi submetido ao pré-tratamento alcalino pela imersão do CAB-H em solução de NaOH 1,0 M; mantendo a concentração de sólidos de 7,5 g/L, procedimento realizado em frascos erlenmeyer de 500 mL. Posteriormente, os frascos foram para autoclave para o tratamento térmico a 121°C durante 30 minutos (ROCHA *et al*, 2009). Após o pré-tratamento, a fração sólida foi separada da líquida por filtração à vácuo. O sólido resultante foi submetido à sucessivas lavagens com H₂O destilada até a neutralização do pH do material na proporção material úmido/água 1:2. Em seguida, o material foi seco a 50°C por 24 horas, triturado e as partículas que ficaram retidas entre os diâmetros de 0,25-0,84 mm foram estocadas separadamente e utilizadas como matéria-prima para a realização dos experimentos. O material seco foi nomeado CAB-OH.

3.5. Caracterização do material lignocelulósico

Os bagaços *in-natura* e pré-tratado com ácido-álcali (CAB e CAB-OH) foram caracterizados quanto às sua composição de extraíveis, celulose, hemicelulose e lignina. Empregaram-se na sua quantificação, a metodologia associada ao protocolo (SLUITER *et al.*, 2008a,b) do instituto NREL (NationalRenewable Energy).

3.6. Complexos enzimáticos

Nesse estudo foram utilizados foram utilizados os complexos Celluclast1.5L (Novozymes), o qual é uma preparação celulásica produzida pelo fungo *Trichoderma reesei* e o NS 50010 (Novozymes) constituídos principalmente por β -glicosidases, ou celobiasas. O complexo Celluclast 1.5L apresentou atividade de celulasas de 154,77 FPU/mL e o NS50010 apresentou atividade de celobiasas de 384,28 CBU/mL.

3.7. Determinação da atividade enzimática dos complexos enzimáticos

3.7.1. Atividade de celulasas, por Unidades de Papel de Filtro (FPU), no complexo Celluclast 1.5L

Na determinação da atividade de celulasas, a atividade foi expressa em unidades de papel de filtro (FPU) por mL do complexo segundo a metodologia proposta por GHOSE (1987). Em tubos de ensaio, adicionou-se tiras de 1 x 6 cm (50 mg) de papel de filtro Whatman nº 1 e 1,0 mL de tampão para pré-incubação à 50 °C. Em seguida, a reação de hidrólise foi iniciada pela adição de 0,5 mL de diferentes diluições enzimáticas. Nas mesmas condições experimentais, realizou-se a reação do branco das diluições enzimáticas (sem a presença do substrato) e branco do substrato (sem a presença da enzima e diferentes diluições do padrão de glicose (10 mg/mL), para construção da curva de calibração. Após 60 min, as reações foram interrompidas com 3 mL do reagente DNS (MILLER, 1959) e fervidas durante 5 min. Logo após, foram adicionados 20 mL de água destilada em cada tubo e a leitura da absorbância feita à 540nm em espectrofotômetro. A concentração de glicose liberada no meio foi determinada utilizando uma curva padrão de glicose.

3.7.2. Atividade de celobiasas, por Unidades de Celobiose (CBU), no complexo NS50010

A determinação da atividade de celobiase foi conduzida segundo a metodologia proposta por GHOSE (1987), com modificações. Utilizou-se solução de celobiose a 15 mM como substrato para a hidrólise. Adicionou-se aos tubos de ensaio 1,0 mL da solução de celobiose, sendo pré-incubados a 50 °C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de diferentes diluições enzimáticas, as quais com a capacidade de produzir cerca de 1,0 mg de glicose. Sob mesmas condições experimentais, também foram realizados os brancos das diluições enzimáticas e o branco do substrato. Transcorridos 30 min, os tubos foram colocados em água fervente por 5 min para interromper a reação. Após centrifugação (6000 rpm/15 min) seguida de filtração, os sobrenadantes foram analisados por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), para quantificação de glicose produzida.

Para calcular atividade de celobiase, determinou-se a massa de glicose presente no meio reacional, convertendo assim em quantidade absoluta de glicose (mg). Construindo um

gráfico semi-log da concentração do extrato enzimático contra massa de glicose gerada, estimou-se a concentração enzimática necessária para liberar exatamente 1 mg de glicose. Encontrada a concentração enzimática desejada, pôde-se determinar a atividade enzimática em CBU/mL.

3.8. Meios de cultura

3.8.1. Meios de propagação e manutenção de células

Para a manutenção das células foi utilizado o meio YEPD constituído por: extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, glicose 20 g/L e ágar sabouraud 20 g/L. Para a propagação das células (obtenção do inóculo) foi utilizado o meio complexo YEPD caldo, contendo extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L e glicose 20 g/L. O pH dos meios foram ajustados para 4,5 utilizando HCl 6 N e a esterilização se deu em autoclave (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) a 110°C por 10 minutos. Para a manutenção das culturas, as mesmas tiveram de ser repicadas periodicamente em placas de Petri, as quais foram mantidas a 4°C.

3.8.2. Meios para processos de sacarificação e fermentação simultâneas

Para os processos de hidrólise e fermentação simultâneas foi utilizado um meio constituído de tampão citrato 50 mM e pH 4,8; suplementado com 1 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de sulfato de amônio, e a carga de CAB-OH desejada em %m/V. Esse meio foi autoclavado a 110°C por 10 minutos.

3.9. Processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

Os processos de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF) foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio reacional. A adição de enzimas precedeu a adição do inóculo (5 g/L) para o início dos ensaios. Os processos foram conduzidos sob agitação de 150 rpm e temperatura de 40 °C por 72 horas. Amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e submetidos à análise. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

As atividades de trabalho para os complexos enzimáticos em todos os processos SSF, no presente estudo, foram de 30 FPU/g_{celulose} para o Celluclast 1.5L (fonte de celulases) e 60 CBU/g_{celulose} para o NS50010 (fonte de celobiasas). Esses valores foram obtidos dos estudos de RODRIGUES (2014), onde 30 FPU/g_{celulose} foi a atividade do complexo de celulases que apresentou melhores resultados com menor quantidade de enzimas comparados com os resultados obtidos entre 50 e 100 FPU/g_{celulose}, e 60 CBU/g_{celulose} foi a atividade recomendada pela literatura (SELIG *et al*, 2008) para evitar a inibição de celulases por celobiasas.

Para cada experimento, os parâmetros determinados foram: a eficiência do processo (Y_E), sendo esse calculado para a quantidade total de celulose adicionada no meio reacional, a produtividade (Q_P) e a porcentagem volume de etanol por volume de solução ($\% V_{\text{etanol}} \cdot V_{\text{solução}}^{-1}$) referente à produção máxima de etanol na solução.

3.9.1. Preparo do inoculo

Para a propagação do inóculo, a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, foi inicialmente ativada em meio YEPD e incubada a 30°C por 48h em estufa microprocessada para cultura bacteriológica SPLabor – SP200 em placas de Petri. Em seguida, transferiram-se 3 colônias para 100 mL de meio YEPD. Mantiveram-se as culturas a 30°C e agitação de 150 rpm por 24 h. Após este tempo, o caldo foi centrifugado a 6.000 rpm por 10 min em centrífuga (analítica Hettich) para se obter a biomassa inicial do processo SSF. Toda a manipulação das culturas foi realizada dentro de uma cabine de segurança microbiológica com fluxo laminar (Pachane PCR-T2) de modo a manter as condições de esterilização.

3.9.2. Avaliação da suplementação enzimática do meio SSF em batelada.

Os ensaios foram realizados com carga de CAB-OH de 7,5 %m/V. No estudo do processo sem suplementação, foi utilizado o complexo Celluclast 1.5L, já no estudo com suplementação foi utilizada a mesma fonte de celulases, além do complexo NS50010.

3.9.3. Avaliação da carga inicial de bagaço em processos, com e sem pré-sacarificação, em batelada.

Nesses ensaios foram utilizados os complexos Celluclast 1.5L como fonte de celulases e NS50010 como fonte de celobiasas. Foram avaliadas diferentes cargas de CAB-OH (%m/V): 7,5; 10; 15 e 20 %, sendo que para cada carga foi estudado o processo sem pré-sacarificação (SSF), e com pré-sacarificação de 12 horas (PSSF).

Não foi possível realizar o estudo com 20% de carga de CAB-OH no processo de SSF, devido ao intumescimento do material, não possuindo fluidização o suficiente a execução do processo.

3.9.4. Avaliação de estratégias de alimentação de bagaço em processos de sacarificação e fermentação simultâneas.

Estratégias de alimentação foram desenvolvidas com o objetivo de buscar amenizar efeitos inibitórios atrelados a processos em batelada com elevadas cargas de sólidos, sendo esses efeitos descritos na literatura (HOYER *et al*, 2013; ZHANG *et al*, 2010; PESSANI *et al*, 2011, LIU *et al*, 2010).

Nesses ensaios foram utilizados os complexos Celluclast 1.5L e NS50010. As alimentações foram realizadas com bagaço seco e diâmetro de partículas entre 0,25-0,84 mm, sendo esse esterilizado com radiação ultravioleta por 15 minutos antes da adição no meio SSF. Salienta-se que não foram adicionadas enzimas nem células ao longo do tempo de processo.

Foram conduzidos, inicialmente, dois experimentos com diferentes estratégias de alimentação de CAB-OH (%m/V), sendo ambos com carga inicial de 10% e final de 20%, Um dos processos foi realizado com duas alimentações de 5% de sólidos em intervalos de 24 horas (FB1) e outro com quatro alimentações de 2,5% de sólidos em intervalos de 12 horas (FB2).

Para o ensaio FB1 foi realizada uma medida da atividade de celulases (FPU/mL) a cada alimentação e na retirada da última alíquota, de forma a verificar se a atividade do complexo é mantida durante o processo, fator de importância para a verificação da manutenção da atividade hidrolítica das enzimas durante o processo semi-contínuo, já que não ocorre alimentações enzimáticas durante os processos.

Em seguida, realizou-se uma estratégia começando com 15% de CAB-OH e chegando a 25% com quatro alimentações de 2,5% de sólidos em intervalos de tempo de 12 horas (FB3). Este processo foi comparado com os anteriores, também em batelada alimentada.

Para os processos FB1, FB2 e FB3, a adição enzimática equivaleu à quantidade de celulose existente no início dos mesmos.

A Tabela 1 resume as estratégias de alimentação adotadas no presente estudo.

Tabela 1. Estratégias de alimentação adotadas no presente estudo para sacarificação e fermentação simultâneas do bagaço CAB-OH.

Nome	Carga inicial de bagaço (%m/V)	Carga final de bagaço (%m/V)	Número de alimentações	Intervalo de tempo entre as alimentações (h)
FB1	10	20	2	24
FB2	10	20	4	12
FB3	15	25	4	12

3.10. Métodos analíticos

A concentração dos carboidratos (glicose e xilose) e etanol foram medidas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, em um sistema de CLAE (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414 e coluna Aminex HPX-87H a 65°C, sendo o eluente H₂SO₄ a 5 mmol.L⁻¹ e vazão de 0,5 mL.min⁻¹. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL e a identificação das amostras foi realizada por comparação do tempo de retenção nas amostras com o tempo de retenção dos padrões.

3.11. Parâmetros de eficiência e rendimento

Os parâmetros cinéticos calculados para análise dos processos em todo o estudo foram:

3.11.1. Eficiência de processo (η)

Esse parâmetro expressa a conversão teórica total da celulose em etanol realizada no processo de sacarificação e fermentação simultâneas, sendo o indicativo da eficiência de processo e expresso através da Equação 1, a qual foi calculada de acordo com a que foi proposta na metodologia do NationalRenewable Energy Laboratory para sacarificação e

fermentação simultâneas NREL/TP-510-42630(DOWE *et al*, 2001). A concentração de celulose utilizada no cálculo foi à total presente no meio reacional, já que os processos de sacarificação e liberação da glicose (açúcar fermentescível), seguido da fermentação e produção de etanol são simultâneos.

$$\eta(\%) = \frac{[EtOH]_f - [EtOH]_i}{(f \cdot [Biomassa_{seca}] \times 1,11) \times 0,511} \times 100 \quad (1)$$

Sendo, $[EtOH]_f$ = produção final de etanol; $[EtOH]_i$ = produção inicial de etanol; f = fração de celulose presente na biomassa seca; $[Biomassa_{seca}]$ = concentração de biomassa seca no meio reacional, ou seja o bagaço CAB-OH. 1,11 é o fator de conversão de celulose em glicose; 0,511 é o fator de conversão de glicose em etanol de acordo com a estequiometria da fermentação, sendo um limite teórico.

3.11.2. Porcentagem de volume de etanol em volume de solução (% $V_{etanol}/V_{solução}$)

Esse parâmetro foi calculado com base na produção máxima de etanol presente nos processos de sacarificação e fermentação simultâneas, de acordo com a Equação 2.

$$\frac{V_{etanol}}{V_{solução}} (\%) = \frac{P_{max}}{\rho} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde ρ é a massa específica do etanol e igual a 789 g/L.

3.11.3. Produtividade de etanol

A produtividade foi calculada com a relação entre a produção máxima de etanol no processo e o tempo no qual ocorreu essa produção (Equação 3).

$$Q_p = \frac{P_{máx} (g \cdot L^{-1})}{t (h)} \quad (3)$$

3.12. Análise Estatística

Para a análise comparativa entre os processos SSF, os parâmetros cinéticos foram submetidos ao teste estatístico ANOVA com nível de confiança de 95% e $\alpha = 0,05$. Este teste mede os desvios entre as variâncias de um grupo de dados experimentais de forma a predizer se a população de dados experimentais possui diferença significativa ou não. A análise estatística foi realizada através do software MicrocalOrigin 8.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da matéria-prima

Na Tabela 2 estão presentes os resultados das caracterizações dos bagaços *in-natura* e pré-tratado. É possível observar que houve uma solubilização da hemicelulose com a diminuição de 65,82 % na sua percentagem em relação ao material sem pré-tratamento (CAB *in natura*), isso ocorreu devido ao efeito do tratamento ácido, conhecido pela sua eficiência em solubilizar a hemicelulose de materiais lignocelulósicos (ROCHA, 2010; ALVIRA *et al.*, 2010). Também é verificado o aumento expressivo da percentagem de celulose do bagaço de caju em relação ao CAB *in natura*, de 20,91 % para 74,72 %, o que corresponde a um aumento 257,3% em celulose. O acúmulo de celulose, por sua vez, pode ser atribuído a redução de 64,18 % na percentagem de lignina, e de 65,82 % na percentagem de hemicelulose, em relação ao percentual inicial presente no bagaço *in natura*, isso ocorre devido aos efeitos combinados do pré-tratamento ácido-álcali no material lignocelulósico (ROCHA, 2010; CARVALHEIRO *et al.*, 2008).

Os efeitos combinados dos pré-tratamentos ácido e básico (solubilização da hemicelulose e deslignificação) minimizam a geração de inibidores do crescimento microbiano como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF), além de aprimorar a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (LEE *et al.*, 2015a), de forma que a matéria lignocelulósica tratada seja utilizada na produção de etanol de segunda geração (ROCHA, 2010; ZHANG *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2014; GABHANE *et al.*, 2014; RODRIGUES, 2014).

CORREIA *et al.* (2015) estudando o pré-tratamento do bagaço do pedúnculo do caju com peróxido de hidrogênio alcalino, conseguiram um aumento de 35 % na quantidade de celulose (20,56 % para 48,23 %), uma remoção de lignina de 77 % (35,26 % para 7,83 %), e em relação à hemicelulose os autores obtiveram um enriquecimento de 112 % (10,17 para 21,61 %), e isso foi conseguido com 6 horas de pré-tratamento com 5 %m/V de CAB e 4,3 %m/V de H₂O₂, pH 11,5, a 35 °C e 150 rpm. Com esse pré-tratamento os autores conseguiram uma maior remoção de lignina que o presente estudo, porém o mesmo conseguiu uma maior concentração de celulose com o pré-tratamento ácido-álcali e uma solubilização de hemicelulose, sendo isso devido ao efeito do pré-tratamento ácido.

A eficiência de remoção de lignina da matéria lignocelulósica é de fato uma importante linha de pesquisa no que se refere a produção de etanol de segunda geração. É o constituinte dos lignocelulósicos que negativamente influencia a hidrólise enzimática da celulose. Contudo diferentes aplicações da lignina estão em investigação para obtenção de produtos com potencial de mercado (ALVIRA et al., 2010).

Tabela 2. Análise composicional do bagaço de caju *in natura* e após o pré-tratamento ácido-álcali (CAB-OH).

Pré-Tratamento	Recuperação de Sólidos (%)	Extraíveis (%)	Sólidos Totais (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina + Cinzas (%)
CAB <i>in natura</i>	100,0 ± 0,00	5,64 ± 0,07	92,90 ± 0,50	20,91 ± 2,03	16,33 ± 3,00	33,62 ± 5,28
CAB-OH	9,34 ± 0,49	0,93 ± 0,18	91,20 ± 0,20	74,72 ± 1,16	5,58 ± 0,04	12,04 ± 0,08

Outros trabalhos na literatura abordam sobre a presença de pectina no bagaço de caju (SANTOS, 2007; BARBOSA, 2010) na faixa de 13,41-78,82%, e como pode ser evidenciado na Tabela 2, o somatório dos percentuais de extraíveis, celulose, hemicelulose e lignina é inferior a 100%, indicando a presença de outro constituinte, possivelmente pectina.

O pré-tratamento ácido-álcali é bastante utilizado em várias matérias lignocelulósicas. LEE *et al* (2015) ressaltaram a importância da deslignificação, causada por esse pré-tratamento, na digestibilidade enzimática da biomassa, sendo que esses autores, realizando o tratamento do sabugo de milho em duas etapas combinadas de pré-tratamento ácido (H_2SO_4 5 % m/V, ou 0,05 M, a 180 °C) com álcali (NaOH 2 % m/V, ou 0,5 M a 80 °C). Foi obtida uma deslignificação de 89 % e a concentração de glucanas (derivados da celulose) aumentou de 30,7 % para 82,5 %, correspondendo a um aumento de 169 % na concentração de glucanas, além do mais o autor conseguiu uma remoção de xilanas (derivados da hemicelulose) de 15,04 % para 4 %, correspondendo a uma remoção de 73 %, sendo que a recuperação de sólidos do pré-tratamento em relação à matéria-prima não tratada foi de 30 % em base seca, resultado superior ao do presente estudo. Apesar da remoção de lignina ter sido superior, o aumento na disponibilização da celulose foi maior no presente estudo.

GIESE *et al* (2013) realizaram o pré-tratamento ácido-álcali de bagaço de cana-de-açúcar, o qual contém 34,64 % de celulose, 18,90 % de hemicelulose, 22,61 % de lignina e 6,41 % de cinzas. O pré-tratamento ácido com 100 mg H_2SO_4 /g_{Bagaço seco}, a 121 °C por 20 minutos, foi seguido do pré-tratamento básico com NaOH 1 % m/V (ou 0,25 M) a 100 °C por

1 hora. Os autores conseguiram obter um bagaço pré-tratado com a composição: 53,06 % de celulose (aumento de 53 % na sua concentração), 7,33 % de hemicelulose (diminuição de 60 % na sua concentração) e 30,65 % de lignina, além de 3,44 % de cinzas. Verificando a concentração de lignina no bagaço pré-tratado é possível verificar que não houve uma efetiva deslignificação do bagaço, sendo isso talvez a baixa concentração de NaOH na realização do pré-tratamento alcalino (0,25 M), enquanto que no presente estudo foi conseguida uma deslignificação de 77 % com a concentração de NaOH de 1M (ou 4 % m/V).

4.2. Avaliação da suplementação enzimática do meio SSF em batelada

Os resultados da avaliação da suplementação enzimática com celobiasas estão apresentados na Figura 10.

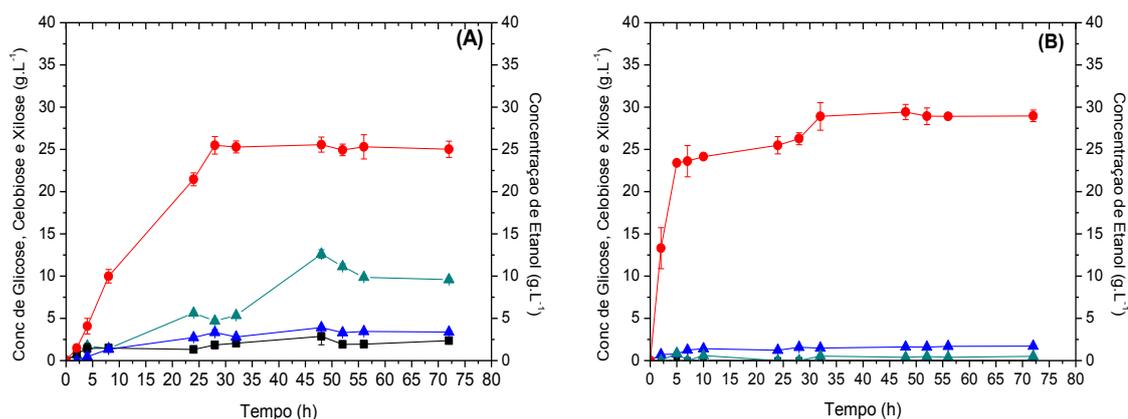


Figura 10. Perfis de concentrações de glicose, celobiose, xilose e etanol com o tempo para os processos SSF utilizando a levedura *K. marxianus* a 40°C e 150 rpm e 7,5% de CAB-OH, sem suplementação (A) e com suplementação (B) de celobiasas do complexo NS50010 (384,28 CBU/mL) com atividade de 60 CBU/g_{celulose}. Glicose (■); Xilose (▲); Celobiose (▲) e Etanol (●).

O processo sem suplementação (Figura 10-A) apresentou um maior acúmulo de celobiose, obtendo uma concentração máxima (13 g/L) em 48 horas de SSF e apresentando ao final cerca de 10 g/L do dímero de glicose. A concentração de glicose apresentou um ligeiro acúmulo em torno de 2,5 g/L ao final do processo. A concentração de xilose também apresentou um acúmulo de aproximadamente 3 g.L⁻¹ ao término do processo SSF.

Por outro lado, resultados diferentes foram obtidos no processo SSF com suplementação (Figura 10-B), o qual não apresentou acúmulo de celobiosenem glicose, enquanto que o único açúcar em excesso foi a xilose, com concentrações de aproximadamente 2 g/L.

A hidrólise da hemicelulose observada pela presença de xilose no meio SSF (Figura 8) pode ser atribuído a presença de xilanasesno complexo Celluclast 1.5L, fato constatado pela literatura (MARTINS et al., 2008; ASK et al., 2012), na qual os autores mencionaram atividade de xilanase de 680 a 1367,1 U/mL nos complexos comerciais de Celluclast 1.5L.

De acordo com as Figura 10-A e 10-B é possível verificar que o processo SSF que foi suplementado levou a uma maior produção de etanol (aproximadamente 30 g/L), enquanto o processo não suplementado apresentou uma menor produção de etanol (aproximadamente 25 g/L). Além disso, foi observado, no processo suplementado, ausência de acúmulo de glicose e celobiose.

Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros calculados para a avaliação da suplementação enzimática nos processos SSF.

Tabela 3. Parâmetros calculados para os processos SSF com meio suplementado com celobiasenem do complexo NS50010e não-suplementado.

Meio SSF	Parâmetros de processo ^a				
	P _{máx} (g/L)	V _{etanol} /V _{solução} (%)	Q _p (g/L.h)	Tempo ^b (h)	η (%)
Suplementado	29,42 ± 0,9	3,73 ± 0,21	0,92± 0,05	32	93,04 ± 2,82
Não-suplementado	24,94± 0,68	3,23 ± 0,13	0,89± 0,04	28	80,61 ± 3,30

^a Os valores dos parâmetros são médias de análises realizadas em triplicata ± desvio padrão

^b Tempo onde foi calculada a produtividade do processo

De acordo com a Tabela 3, o processo suplementado apresentou melhores resultados em todos os parâmetros: produção de etanol (29,42 ± 0,9 g.L⁻¹), %V_{etanol}.V_{solução}⁻¹ (3,73 ± 0,21%), eficiência de processo (93,04 ± 2,82%) e produtividade (0,92 ± 0,05 g/L.h), ficando evidente a melhoria na performance do processo SSF devido à suplementação.

Diversos estudos na literatura reportam a utilização do complexo enzimático comercial de celulasenem Celluclast 1.5L (oriundo do fungo filamentoso *Trichoderma reesei*) com suplementação de β-glicosidasenem para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica (KÁDÁR, et al, 2004; ZHAO et al; 2012; WANDERLEY et al, 2013; LI et al, 2014;

CUEVAS *et al*; 2015; LEE *et al*, 2015; RODRIGUES *et al*, 2015; ZHAO *et al*, 2015), dando indicativo de uma deficiência de celobiasas nesse complexo comercial.

RODRIGUES (2014) realizou estudos sobre produção de etanol por processo SSF a partir do bagaço de caju pré-tratado com ácido-álcali (CAB-OH), utilizando *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907. Para o processo com celulases de Celluclast 1.5L a 15 FPU/g_{celulose} e 40 °C, a autora indicou a necessidade de suplementação com celobiasas ou a avaliação de outros complexos enzimáticos que reduzissem o acúmulo de celobiose observado, haja vista que a ausência da suplementação levou a uma diminuição no rendimento e eficiência do processo SSF, e isso ocorreu devido a uma inibição da atividade de celulases devido a um acúmulo de celobiose no meio SSF, reduzindo a performance do processo.

RODRIGUES *et al* (2015) estudando a hidrólise da palha de arroz, após pré-tratamento alcalino, e a recuperação dos hidrolisados para a produção de etanol, obtiveram eficiência de hidrólise de 52% e 81% para os processos com e sem suplementação de β -glicosidades, respectivamente. De forma que a suplementação de celobiasas se fez necessária para uma hidrólise enzimática mais efetiva.

Dessa forma, foi justificada a necessidade de suplementação de celobiasas no processo SSF, haja vista que isso reduz o acúmulo de celobiose, elevando a eficiência da hidrólise e, assim, aumentando o rendimento e eficiência em etanol do processo SSF.

4.3. Avaliação da carga inicial de bagaço no processo SSF, com e sem pré-sacarificação, em batelada.

Foi realizada a avaliação da carga de bagaço em processos com (PSSF) e sem pré-sacarificação (SSF). Nas Figuras 11A-F, são apresentados os perfis de concentração de etanol e glicose ao longo do tempo para os processos SSF e PSSF, usando as cargas de CAB-OH de 7,5, 10 e 15 %m/V.

Observa-se na Figura 11 que não houve diferença expressiva na produção de etanol entre os processos SSF e PSSF quando foram utilizadas cargas de CAB-OH de 7,5 e 10%. Para a carga de 7,5 % (Figuras 11A e 11B), a produção de etanol obtida foi aproximadamente 29 g/L em ambos os processos (SSF e PSSF), já para a carga de 10% (Figuras 11C e 11D), a produção de etanol foi aproximadamente 41 g/L. No entanto, utilizando a carga de 15%, a produção de etanol foi diferente comparando os dois processos (SSF e PSSF) obtendo uma produção máxima de etanol de 58 g/L e 50 g/L, respectivamente.

As concentrações de glicose próximas de zero ao longo dos processos SSF com cargas de CAB-OH de 7,5% (Figura 11A) e 10% (Figura 11C) e também a partir de 12 horas dos processos PSSF com carga de 7,5% (Figura 11B) e 10% (Figura 11D), indicam que a levedura fermentou a glicose em concomitância com a hidrólise enzimática da celulose. Já para a carga de 15% foi observado, em ambos os processos SSF e PSSF, um acúmulo em torno de 5 g/L de glicose.

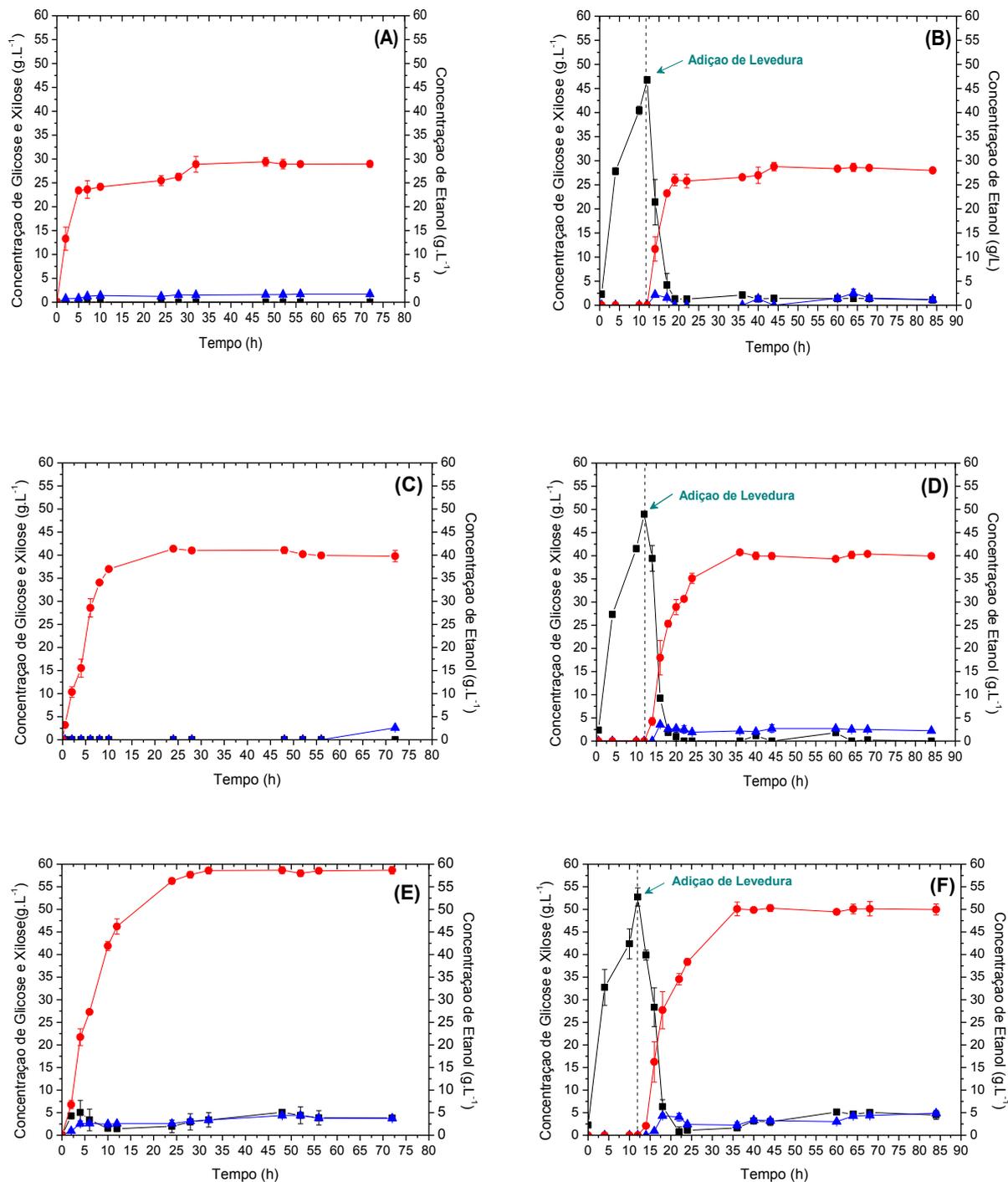


Figura 11. Perfis de concentrações de glicose, xilose e etanol com o tempo, para os processos SSF e PSSF utilizando a levedura *K. marxianus* a 40 °C e 150 rpm, usando diferentes cargas de bagaço de caju (CAB-OH em %m/V): SSF 7,5% (A), PSSF 7,5% (B), SSF 10% (C), PSSF 10% (D), SSF 15% (E) e PSSF 15% (F). Glicose (■); Xilose (▲) e Etanol (●). Linha tracejada na vertical representa a separação entre a etapa de pré-sacarificação e a etapa de sacarificação

Não foi possível a realização de uma SSF (sem pré-sacarificação) com carga de 20%, haja vista que o intumescimento do meio de cultura provocado por essa elevada carga de CAB-OH não permitiu uma fluidização adequada para o início do processo. Neste sentido, realizou-se um processo PSSF com 20% de carga de CAB-OH, sendo os resultados apresentados na Figura 12.

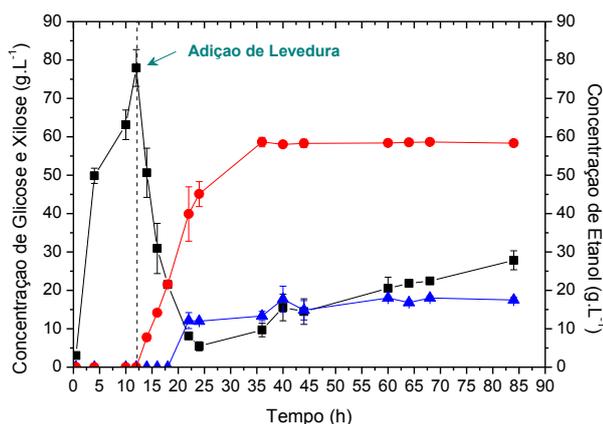


Figura 12. Perfis de concentrações de glicose, xilose e etanol com o tempo para o processo PSSF (adição da levedura *K. marxianus* com 12 h de sacarificação) com carga de CAB-OH de 20 %. Glicose(■); Xilose(▲) e Etanol (●). Linha tracejada na vertical representa a separação entre a etapa de pré-sacarificação e a etapa de sacarificação e fermentação simultâneas.

De acordo com a Figura 12, é possível verificar que a produção máxima de etanol foi de 58 g/L e esse resultado é similar ao processo SSF com carga de 15% (Figura 11F). A partir de 24 h de processo houve um acúmulo de glicose, sendo que essa atingiu a concentração de 30 g/L ao final do processo SSF, juntamente com a xilose que atingiu aproximadamente 19 g/L.

O acúmulo dos açúcares monoméricos (glicose e xilose) nas Figuras 11E-F e 12, ocorreu devido a efeitos de inibição da atividade microbiana causada pela elevada concentração de sólidos, além da elevada viscosidade do meio (HOYER *et al*, 2013, ZHANG *et al*, 2010).

Na literatura, estudos relatam a existência da inibição do processo de sacarificação e fermentação simultâneas em batelada devido à elevada concentração de substrato que pode afetar simultaneamente o metabolismo da levedura e a hidrólise enzimática (RUDOLF *et al*, 2005; SURYAWATI *et al*, 2008).

Na Tabela 4 estão presentes os parâmetros dos processos SSF e PSSF nas diferentes cargas de CABOH estudadas. Com esses dados, realizaram-se testes estatísticos do

tipo ANOVA. No processo com 7,5% CAB-OH (processos SSF e PSSF) todos os parâmetros foram similares com exceção para a produtividade que foi significativamente diferente. Para a carga de 10% os parâmetros foram similares, com exceção da produtividade que foi significativamente diferente. Esta diferença nas produtividades, entre os processos SSF e PSSF, deve-se ao tempo total de PSSF, o qual possui 12 horas a mais que o SSF. Os processos SSF e PSSF com carga de 10% foram os mais eficientes (98,41%). Para a carga de 15% todos os parâmetros foram diferentes com um nível de confiança de 95%, sendo os maiores valores obtidos para o processo SSF, incluindo a maior produtividade (1,83g/L.h). O processo com carga de 20% apresentou produção de etanol similar ao SSF com carga de 15% (58 g/L) e a uma elevada produtividade (1,62 g/L), apesar da menor eficiência (69%).

Tabela 4. Parâmetros cinéticos calculados para os processos SSF e PSSF a 40 °C usando a levedura *K. marxianus* ATCC 36907, com diferentes cargas de bagaço de caju.

Carga de CAB-OH (%)	Condução do Processo	Parâmetros de processo				
		P _{máx} (g/L)	V _{etanol} .V _{solução} ⁻¹ (%)	Q _P (g/L.h ⁻¹)	Tempo ⁱ (h)	η (%)
7,5	SSF	29,42 ± 0,90 ^a	3,73 ± 0,11 ^a	0,90 ± 0,05 ^a	32	93,04 ± 1,31 ^a
	PSSF	28,77 ± 0,89 ^a	3,65 ± 0,21 ^a	0,65 ± 0,02 ^b	44	91,43 ± 2,85 ^a
10	SSF	41,41 ± 0,22 ^b	5,25 ± 0,03 ^b	1,73 ± 0,01 ^c	24	98,41 ± 0,39 ^b
	PSSF	40,72 ± 1,10 ^b	5,16 ± 0,09 ^b	1,13 ± 0,03 ^d	36	97,40 ± 1,14 ^b
15	SSF	58,67 ± 0,74 ^c	7,45 ± 0,09 ^c	1,83 ± 0,02 ^e	32	92,68 ± 1,16 ^c
	PSSF	50,11 ± 1,53 ^d	6,37 ± 0,10 ^d	1,39 ± 0,04 ^f	36	79,51 ± 2,51 ^d
20	PSSF	58,64 ± 0,57 ^c	7,43 ± 0,09 ^c	1,62 ± 0,01 ^g	36	69,35 ± 0,49 ^e

Os valores dos parâmetros são médias de análises realizadas em triplicata ± desvio padrão das amostras. Valores com as mesmas letras, em sobrescrito, e na mesma coluna, não são significativamente diferentes um do outro com um nível de confiança de 95 % (P < 0,05).

ⁱTempo onde foi calculada a produtividade do processo

As leveduras sofrem um efeito de regulação metabólica chamado de “Efeito Crabtree” ou “Contre-effet Pasteur”. Para leveduras que sofrem a ação desse efeito (Crabtree positivas), quando estão submetidas a elevadas concentrações de substrato, ocorre a repressão do efeito Pasteur (inibição da atividade fermentativa pela respiração), favorecendo, desse modo, a fermentação alcoólica (DEKEN, 1966). Geralmente, linhagens de *Kluyveromyces marxianus* são classificadas como Crabtree negativas (FONSECA et al., 2008),

pois na presença de elevadas concentrações de substrato, o efeito Pasteur é favorecido e a atividade fermentativa é reprimida pela respiração (DEKEN, 1966).

Essa repressão da atividade metabólica é uma explicação plausível para a baixa eficiência do processo PSSF com carga de 20% (69 %), além da menor eficiência do processo PSSF com carga de 15% (79 %) frente ao SSF com a mesma carga (92,68 %). A elevada carga de glicose no início da fermentação desses processos (PSSF com carga de 15 e 20 %) pode ter causado a repressão metabólica da fermentação em detrimento da respiração (Efeito Pasteur).

KÁDÁR *et al* (2004) estudaram processos SSF e PSSF para a produção de etanol a partir de resíduos de papel, utilizando *Kluyveromyces marxianus* Y01070, sendo que o processo PSSF foi chamado de NSSF (Sacarificação e Fermentação Simultâneas Não-isotérmica), pois a etapa de pré-hidrólise, realizada por 24 horas, foi realizada a uma temperatura diferente (50 °C) da etapa de 96 horas de sacarificação e fermentação simultâneas (40 °C). Foram utilizados três tipos de substratos com carga de sólidos de 6 % m/V: lama de papel, papelão velho ondulado e celulose pura (FS&D, Urbana, IL, EUA), sendo obtidos melhores rendimentos em etanol e conversões teóricas da celulose em todos os processos SSF, comparativamente aos processos NSSF, para os três tipos de substrato, sendo a maior conversão teórica da celulose no valor de 58,1 % e o maior rendimento em etanol de 0,325 g_{etanol}/g_{glicose}, ambos os parâmetros para o processo com lama de papel como substrato. Esses resultados são inferiores ao do presente estudo.

ÖGREN *et al* (2007) estudaram processos PSSF (sacarificação e fermentação simultâneas com pré-sacarificação) para a produção de etanol por palha de milho, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* comercial. Os autores realizaram estudos com diferentes complexos enzimáticos e utilizaram a temperatura de hidrólise enzimática ideal para cada um dos complexos: 48°C para o complexo Celluclast 1.5L, suplementado com uma preparação de β -glicosidade (Novozymes) e 55°C para o complexo termo-ativo, constituído de celobiohidrolases, endoglucanases, β -glicosidades e xilanases, desenvolvido por Roal Oy na Finlândia. O tempo de pré-sacarificação foi de 16 horas e depois desse tempo a temperatura foi diminuída para 35°C para o início do processo SSF, sendo que o processo com pré-sacarificação e sem pré-sacarificação foi testado para cada complexo enzimático. Os resultados mostraram que, apesar de ter apresentado maior produtividade (medida com 24 horas para todos os processos), os processos PSSF não proporcionaram uma melhora

nas produções máximas de etanol em relação aos processos SSF. Os resultados desses autores estão de acordo com os do presente estudo.

MORENO *et al* (2013) estudaram a produção de etanol a partir de palha de trigo, pré-tratada por explosão a vapor, por processos SSF e PSSF e variando a carga de sólidos (5, 6, 10 e 12 %m/V) utilizando *Kluyveromyces Marxianus* CECT10875, sendo o tempo de pré-sacarificação de 8 horas e o tempo de processo SSF de 72 horas. Os autores concluíram que os processos SSF foram mais eficientes que os PSSF, sendo que no processo SSF com carga de 12 % foi atingida uma produção máxima de etanol de 16,7 g/L e uma eficiência de processo de 74,2 %. Nos processos SSF e PSSF com carga de 10 % foi obtida similar produção de etanol de 13,8 g/L e eficiência de processo de 73,5 %. Esses resultados são inferiores aos do presente estudo, já que no mesmo foi atingida uma eficiência de processo de 98 % nos processos SSF e PSSF com carga de 10 %.

PEJO *etal* (2009) realizaram a produção de etanol a partir de sacarificação e fermentação simultâneas de palha de trigo com uma etapa de pré-sacarificação de 8 horas, por *K. marxianus* CECT10875. Os autores utilizaram celulasas do complexo NS50013 e suplementaram com β -glicosidades do complexo NS50010, ambos sendo fornecidos pela Novozymes. Dessa forma os autores realizaram experimentos SSF em batelada com cargas de 10, 12 e 14%, verificando que a maior concentração de etanol foi atingida com a carga de 14% (30 g/L), que corresponde a uma eficiência de 54%. Os resultados do presente estudo foram superiores ao estudo desses autores, haja vista que foi conseguida uma eficiência de 92 % com uma SSF realizada com carga de sólidos de 15 %.

DEVANTIER *et al* (2005) citou que em muitas plantas de produção de etanol existe a etapa de pré-sacarificação da biomassa com o objetivo de otimizar a fermentação, mas que essa etapa de pré-hidrólise não é desejada, pois diminui a simplicidade do processo como um todo e aumenta o risco de contaminação em processos industriais. E, dessa forma, ressalta-se a preferência por processos SSF para estudos posteriores, haja vista que esses apresentaram resultados satisfatórios frente aos processos PSSF, e que o tempo de operação é menor (72 horas), agregando, assim, um custo operacional menor para processos sem a pré-sacarificação.

LIU *et al* (2010) citaram, no seu trabalho, que uma elevada concentração inicial de substrato no meio de sacarificação e fermentação simultâneas pode interferir negativamente na hidrólise da celulose e que são necessárias estratégias de alimentação de substrato de forma a prevenir inibições inerentes ao processo, tanto pelo substrato como pelo produto.

Dessa forma, estratégias de alimentação de substrato, em conjunto com os processos SSF, devem ser estudadas de forma a eliminar efeitos inibitórios, de substrato ou produto, presentes no processo que resultaram em uma baixa eficiência do mesmo (aproximadamente 70%).

4.4. Avaliação de estratégias de alimentação de bagaço no processo de sacarificação e fermentação simultâneas.

O estudo de estratégias de alimentação gradual de substrato com o objetivo de aumentar a concentração de etanol e, ao mesmo tempo, eliminar problemas relacionados a elevadas concentrações de substrato nos processos realizados em batelada têm sido reportados na literatura (PAULOVÁ *et al*, 2014; YANG *et al*, 2010; HOYER *et al*, 2013; ZHANG *et al*, 2010; PESSANI *et al*, 2011, LIU *et al*, 2010).

Dessa forma, foram realizados processos com estratégias de alimentação gradual de substrato para atingir elevadas concentrações de sólidos (20% e 25%), utilizando CAB-OH como substrato.

Na Figura 13 são apresentados os perfis de concentração de glicose, xilose e etanol para os processos SSF, em batelada alimentada, iniciados com 10% de carga de CAB-OH (em %m/V) e terminados com 20%: Figura 13A (com duas alimentações) e 13B (com quatro alimentações), respectivamente.

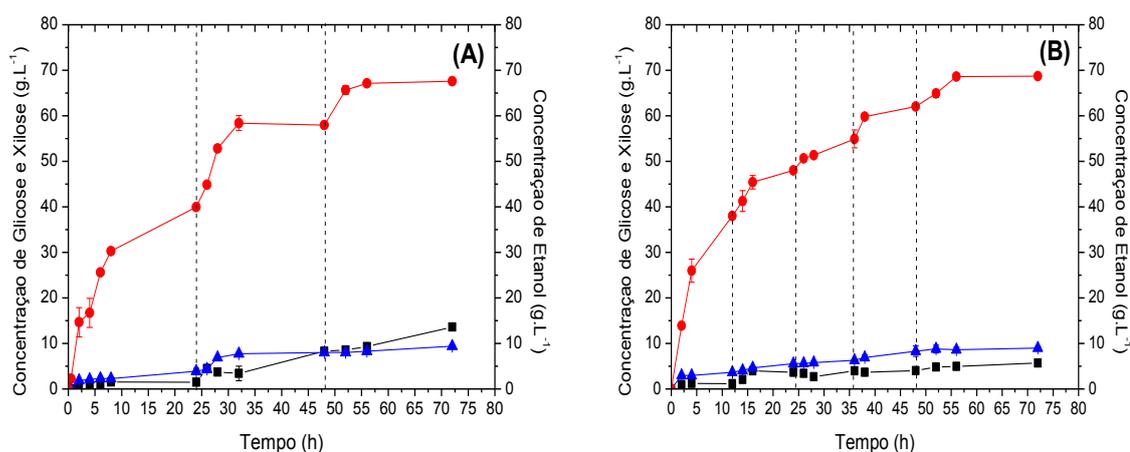


Figura 13. Perfis de concentrações de glicose, xilose e etanol com o tempo para os processos SSF em batelada alimentada com carga inicial (%m/V) de CAB-OH de 10% e carga final de 20%, com estratégia de duas alimentações (A) e quatro alimentações (B),

sendo FB1 e FB2, respectivamente. As linhas tracejadas na vertical correspondem aos pontos de alimentações de bagaço CAB-OH. Glicose(■); Xilose(▲) e Etanol (●).

Observando as Figuras 13A-B verifica-se que, a cada adição de substrato, houve um concomitante aumento na produção de etanol, culminando com uma constância na produção de etanol em torno de 68g/L para ambos os processos. A concentração de glicose aumentou durante o processo com duas alimentações (FB1), atingindo 15 g/L em 72 horas de processo, da mesma forma que para a xilose, que atingiu 10 g/L em 72 horas. Para o processo com quatro alimentações (FB2) a concentração de glicose atingiu 5 g/L ao final de 72 horas, enquanto a concentração de xilose atingiu 9 g/L. Dessa forma, os processos apresentaram similar produção de etanol e o processo com quatro alimentações (FB2) apresentou menores acúmulos de glicose e xilose no meio reacional.

O acúmulo dos açúcares monoméricos (glicose e xilose) representa que a capacidade hidrolítica das enzimas está superando a capacidade fermentativa da levedura, devido a uma diminuição progressiva da tolerância ao etanol da membrana plasmática das leveduras *Kluyveromyces marxianus* ao longo do processo (BAJPAI *et al*, 1982; ROSA e SACORREIA *et al*, 1992).

A fim de monitorar a capacidade hidrolítica, foi realizada a medição da atividade enzimática do complexo de celulasas (FPU/mL) durante o processo FB1, sendo verificado, dessa maneira, que a mesma permaneceu aproximadamente $153,42 \pm 0,94$ FPU/mL, atividade muito próxima à atividade medida para o complexo puro (154,77 FPU/mL). De forma que foi constatada a manutenção da capacidade hidrolítica das enzimas durante o processo SSF e sua atividade de 30 FPU/g_{celulose}.

No trabalho de PESSANI *et al* (2011), a adição de enzimas ocorreu somente em relação à carga inicial de substrato, não ocorrendo alimentação de enzimas ao longo do mesmo, de forma semelhante ao presente estudo. Esses resultados ajudam a concluir que a adição de enzimas somente no início do processo de sacarificação e fermentação simultâneas em batelada alimentada e com volume equivalente à quantidade inicial de sólidos já presentes inicialmente no meio, sem adições durante as alimentações, não influiu negativamente na eficiência do processo, além de permitir uma economia no custo do processo SSF. De forma que essa estratégia de não alimentar enzimas durante os ensaios foi mantida no presente estudo em todos os processos em batelada alimentada.

Com isso, os processos SSF em batelada alimentada foram analisados em relação ao processo em batelada de sacarificação e fermentação simultâneas com pré-sacarificação (PSSF) e com carga de CAB-OH de 20%, sendo verificado que ambos os processos semicontínuos melhoraram em 17% a produção máxima de etanol, e em 16% a eficiência, em relação ao processo em batelada.

RUDOLF *et al* (2005) compararam a produção de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas em batelada e batelada alimentada de madeira de uma conífera do gênero *Picea*. Os autores estudaram processos em batelada e batelada alimentada, sendo os descontínuos com a carga de 10% de sólidos e os semi-contínuos com a carga inicial de 6% e a final de 10 %, variando a concentração de inoculo (2, 3 e 5 g/L). Esses concluíram que não houve diferença significativa na eficiência e produção máxima de etanol entre os processos, atingindo uma produção de etanol em batelada alimentada com 5 g/L de células de 42 g/L, resultado bem similar à produção de etanol em batelada com carga de 10% de sólidos no presente estudo. Os autores, porém, não realizaram experimentos com carga maior de sólidos. Enquanto os autores desse trabalho não conseguiram uma diferença significativa entre os processos descontínuos e semi-contínuos com uma menor carga de sólidos, o presente estudo conseguiu uma diferença significativa, aumentando em 17 % a concentração de etanol no caldo fermentado com o processo apresentando elevada carga de sólidos, em relação aos processos em batelada SSF com carga de 15 % e PSSF com carga de 20%.

Entre as duas estratégias de alimentação (FB1 e FB2), a que apresentou melhores resultados foi a com quatro alimentações (FB2), haja vista que essa apresentou menor acúmulo de glicose no meio reacional ao final de 72 horas, sendo de aproximadamente 5 g/L (Figura 11B). Dessa forma, a estratégia com quatro alimentações (uma alimentação a cada 12 horas) foi escolhida para a continuidade do projeto.

Em seguida, foi realizado um processo em batelada alimentada com carga inicial de 15% de CAB-OH e final de 25% (FB3), visando obter uma maior concentração de etanol e o resultado com os perfis de concentração de glicose, xilose e etanol com o tempo estão apresentados na Figura 14.

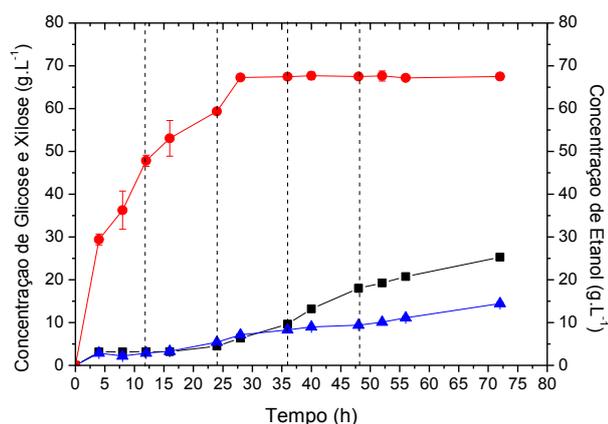


Figura 14. Perfis de concentração de glicose, xilose e etanol com o tempo para o processo em batelada alimentada com carga inicial (%m/V) de 15% e final de 25% com estratégia de alimentação de 4 alimentações (FB3). As retas tracejadas na vertical correspondem às alimentações de substrato. Glicose (■); Xilose(▲) e Etanol(●).

Com a Figura 14, é possível verificar que a produção de etanol atingiu 68 g/L em 28 horas de processo, permanecendo constante até o fim do mesmo. As concentrações de glicose e xilose acumularam e atingiram, aproximadamente, 25 g/L e 15 g/L, respectivamente, ao final do processo. Esse acúmulo dos açúcares monoméricos (glicose e xilose) ocorreu devido à continuidade da atividade hidrolítica em detrimento da cessão da atividade microbiana.

A Tabela 5 apresenta os parâmetros calculados para os processos em batelada alimentada com carga inicial de 10% de CAB-OH e final de 20% (com duas e quatro alimentações) e com carga inicial de 15% e final de 25%.

Tabela 5. Parâmetros calculados para os processos em batelada alimentada com carga inicial (%m/V) de 10% de CAB-OH e final de 20% (com duas e quatro alimentações) e a batelada alimentada com carga inicial (%m/V) de 15% e final de 25% com quatro alimentações.

<i>Estratégias de alimentação</i>					<i>Parâmetros de processo</i>				
Nome	Carga inicial (%m/V)	Carga final (%m/V)	Nº de alimentações	Intervalo entre alimentações (h)	P _{máx} (g/L)	V _{etanol} /V _{solução} (%)	Q _p (g.L.h ⁻¹)	Tempo ^c (h)	η (%)
FB1	10	20	2	24	67,90 ± 0,44 ^a	8,61 ± 0,04 ^a	1,21 ± 0,01 ^a	56	80,53 ± 0,40 ^a
FB2	10	20	4	12	68,02 ± 0,48 ^a	8,62 ± 0,04 ^a	1,21 ± 0,02 ^a	56	80,67 ± 0,35 ^a
FB3	15	25	4	12	67,87 ± 0,53 ^a	8,60 ± 0,05 ^a	2,42 ± 0,01 ^b	28	64,05 ± 0,51 ^b

Os valores dos parâmetros são médias de análises realizadas em triplicata ± desvio padrão das amostras. Valores com as mesmas letras, em sobrescrito, e na mesma coluna, não são significativamente diferentes um do outro com um nível de confiança de 95 % (P < 0,05).

^cTempo onde foi calculada a produtividade do processo.

Uma análise do tipo ANOVA foi realizada para a produção máxima de etanol entre os processos em batelada alimentada na Tabela 5 e foi verificado que os valores são similares, de forma que os processos não apresentaram diferença significativa nesse parâmetro. Da mesma forma aconteceu para a porcentagem volume de etanol por volume de solução ($\% V_{\text{etanol}}/V_{\text{solução}}$), onde os parâmetros foram similares dentro do desvio padrão das amostras para os três processos (FB1, FB2 e FB3).

A produtividade e a eficiência foram similares estatisticamente para os processos FB1 e FB2. Já o processo FB3, apesar de possuir a menor eficiência de processo ($64,05 \pm 0,70\%$), possuiu a mais elevada produtividade ($2,42\text{g/L.h}^{-1}$) devido ao fato de ter atingido a produção máxima de etanol com 28 horas de processo seguida cessão da atividade fermentativa. A baixa eficiência do processo FB3 se deveu ao cálculo desse parâmetro ocorrer com a carga total de bagaço adicionada ao meio SSF, que, no caso desse processo, é a maior carga de CAB-OH do estudo: 25 %.

Dessa forma, mesmo alimentando até uma carga maior de sólidos (25%), o processo FB3 atingiu similar concentração de etanol em relação a FB1 e FB2. Isso dá um indicativo de um possível limite de tolerância para a levedura *K. marxianus* ATCC36907 em torno de 68 g/L de etanol no caldo fermentado, quando a atividade fermentativa cessou em torno de 28 horas de processo.

Outros estudos relataram a cessão da atividade fermentativa de cepas de *K. marxianus* associada à concentração de etanol. SURYAWATI *et al* (2008) descreveu, em seu trabalho, a cessão da produção de etanol de *K. marxianus* IBM4 com 72 horas à 45°C, e com 96 horas à 41°C, de sacarificação e fermentação simultâneas, mas essa inibição da produção do etanol ocorre não só devido à concentração do mesmo, mas também devido à concentração de ácido acético produzido. O autor descreveu que a inibição aconteceu pelo conjunto de fatores: elevada temperatura, concentração de etanol e baixo pH causado pela concentração de ácido acético no meio reacional. Já BALLESTEROS *et al* (2004) descreveu a cessão da atividade fermentativa de *K. marxianus* CECT 10875 à 42°C entre 72 e 82 horas de sacarificação e fermentação simultâneas, mas que essa inibição se deu a um stress metabólico causado pela baixa concentração de glicose e elevada concentração de etanol no meio fermentativo. ZAFAR *et al* (2006) também descreveu a inibição da atividade fermentativa para a produção de etanol a partir de *K. marxianus* MTCC 1288 devido à concentração de mesmo.

PESSANI *et al* (2011) realizaram estudos de produção de etanol de segunda geração através de sacarificação e fermentação simultâneas da palha de *Panicum virgatum*, uma árvore nativa da América do Norte, utilizando *K. marxianus*. Os autores realizaram estudos em batelada e batelada alimentada. Os autores obtiveram um rendimento de 82 %, similar ao do presente estudo para os processos FB1 e FB2.

PEJO *etal* (2009) realizaram a produção de etanol a partir de sacarificação e fermentação simultâneas, com batelada alimentada, de palha de trigo, por *K. marxianus*CECT10875, sendo que foram utilizadas celulasas do complexo NS50013 e β -glicosidades do complexo NS50010, ambos sendo fornecidos pela Novozymes. Foram realizadas estratégias de alimentação para atingir uma maior concentração de etanol no processo com elevadas cargas de sólidos (14 % m/V) Dessa forma a maior concentração de etanol foi atingida (36 g/L) com a estratégia de carga inicial de 10% e uma única alimentação de 4% em 12 horas e 72 horas de processo SSF. Os autores relataram um aumento de 20% na concentração de etanol no meio reacional, em relação ao processo em batelada.

ZHANG *et al* (2010) também realizaram processos em batelada alimentada, em conjunto com sacarificação e fermentação simultâneas, com elevadas cargas de sólidos, para a produção de etanol a partir de celulose de sabugo de milho, pré-tratado com H₂SO₄, seguido de NaOH, por *Saccharomyces cerevisiae*. Os experimentos partiram de carga inicial de 19% e atingindo 25%, sendo que foram variados os intervalos de adição (2, 4 e 8h). As dosagens enzimáticas com complexo Cellulase GC220 corresponderam à atividade de 22,8 FPU/g_{glucanos}. Os autores obtiveram uma eficiência de 79,6% com o intervalo de adições de 4 horas, resultado superior ao do presente estudo, atingindo uma concentração de CAB-OH de 25%, a eficiência obtida foi de 64%. O resultado dos autores pode ter sido superior pela utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e essa apresentar maior tolerância ao etanol (ROSA e SA-CORREIA *et al*, 1992).

Os resultados do presente trabalho foram superiores aos de BALLESTEROS *et al* (2002), sendo que esses autores realizaram batelada alimentada com SSF para a produção de etanol a partir de papel reciclado pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, a partir de *K. Marxianus* CECT 10875. Os autores partiram de uma carga inicial de 5% e chegaram a 10% com adições de 3 e 2%, a cada 24 horas. Essas alimentações também contiveram adições de enzimas, de forma a manter a atividade de 15 FPU.g_{celulose}⁻¹. Os autores, mesmo utilizando uma baixa carga de sólidos, obtiveram uma eficiência de 79,7%, enquanto que no presente

estudo, com elevadas cargas de sólidos e sem alimentação enzimática, foi obtida uma eficiência de aproximadamente 81%.

De acordo com ZHANG *et al* (2010) e PEJO *et al* (2009), a $\% V_{\text{etanol}}/V_{\text{solução}}$ mínima necessária para que a destilação do caldo fermentado seja viável economicamente é de 4%. Dessa forma, se baseando apenas nesse parâmetro, todos os processos em batelada e batelada alimentada são viáveis tecnicamente para destilação, menos os processos SSF e PSSF com carga de 7,5%.

Nos processos em batelada alimentada, a adição de enzimas ocorreu só no início dos processos SSF e sem adição enzimática durante os mesmos. De forma que os processos FB1 e FB2 apresentaram similar gasto enzimático em relação ao processo SSF com carga de 10%, sendo que os processos FB1 e FB2 aumentaram em 66% a produção em etanol em relação ao processo em batelada, porém ocorreu o gasto com matéria-prima foi o dobro no semi-contínuo. O processo FB3 também apresentou similar gasto enzimático que o processo SSF com carga de 15 %, apesar do gasto com matéria-prima ter sido 1,6 vezes maior para o processo semi-contínuo, o qual apresentou um aumento de 17 % na produção de etanol em relação ao processo em batelada. Os processos que apresentaram similar gasto com matéria-prima foram FB1, FB2 e o PSSF com carga de 20 %, porém esse processo em batelada apresentou o dobro do gasto enzimático dos processos FB1 e FB2 (com similar gasto enzimático entre si), e esses processos em batelada alimentada aumentaram em 17% a produção de etanol em relação aos processos em batelada SSF com carga de 15 % e PSSF com carga de 20%.

Dessa forma, entre todos os processos, em batelada e batelada alimentada, o que apresentou maior eficiência foi o SSF com carga de 10 % (98 %), porém os processos em batelada alimentada apresentaram maior e similar produção de etanol de 68 g/L.

Entre os processos semi-contínuos, o que apresentou menor acúmulo de açúcares monoméricos (glicose e xilose) e similar gasto enzimático ao SSF com carga de 10 %, foi o processo com carga inicial de 10 % e final de 20 % (FB2). No entanto, o processo FB3 (carga inicial de 15 % e final de 25 %, com 4 alimentações), apesar de ter possuído a menor eficiência, apresentou a maior produtividade do estudo.

4.5. Balanço de massa

O balanço de massa nos processos SSF se faz necessário para verificar a produção de etanol a partir do consumo da matéria prima: o bagaço do pedúnculo do caju *in natura*, e comparar a viabilidade de alguns processos SSF realizados no estudo quanto à demanda de matéria prima. Para isso é necessário calcular o rendimento de etanol em relação à quantidade de bagaço *in natura* ($Y_{E/CAB}$), o qual é obtido através do balanço de massa (Figura 15) para o processo desde o pré-tratamento até a produção do etanol ao final do processo SSF.

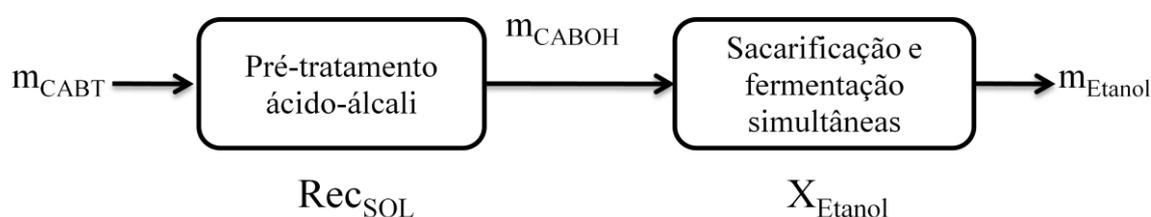


Figura 15. Fluxograma representativo do balanço de massa nas etapas do processo de produção de etanol por Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF) a partir do bagaço do pedúnculo do caju em base seca.

Primeiramente o bagaço de caju seco é obtido após pré-tratamento primário (CAB_T) é submetido ao pré-tratamento ácido (H_2SO_4) seguido de álcali ($NaOH$), sendo Rec_{SOL} a fração de recuperação de sólidos após o pré-tratamento da matéria-prima e seu valor igual a 0,095. O sólido recuperado após o pré-tratamento (m_{CAB-OH}) é submetida ao processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF), onde é transformado em etanol (m_{Etanol}), sendo X_{Etanol} a fração do $CABOH$ que é transformada no produto principal da fermentação, a qual depende da eficiência do processo SSF (η em %).

Com isso, foi possível calcular o rendimento de bagaço *in natura* (CAB) em etanol ou rendimento global em etanol ($Y_{E/CAB}$), dividindo a massa de etanol no final do fluxo do processo pela massa de bagaço CAB_T no início do mesmo (Figura 15), sendo obtido o rendimento de etanol em relação a 1 Kg de bagaço em base seca (g_{Etanol}/Kg_{CAB}).

Esse foi obtido para os processos SSF em batelada com carga de 7,5, 10 e 15 %, PSSF em com carga de 20 %, além dos processos em batelada alimentada com carga inicial de 10 % e final de 20 % e quatro alimentações (FB2), e carga inicial de 15 % e final de 25 % com quatro alimentações (FB3). O rendimento global em etanol foi calculado de acordo com

relação à produção máxima de etanol de cada processo e com a carga de bagaço presente no meio, relativa a essa produção máxima.

Os resultados do cálculo do rendimento de CAB em etanol ($Y_{E/CAB}$) estão na Figura 16.

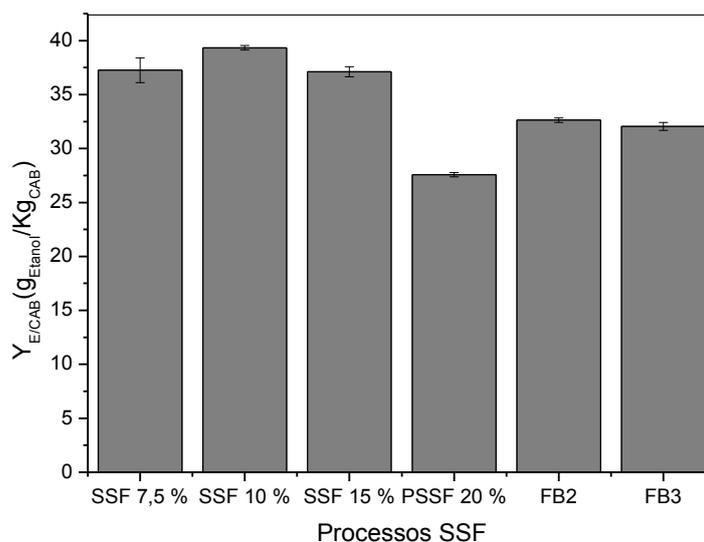


Figura 16. $Y_{E/CAB}$ (g_{Etanol}/Kg_{CAB}) para os processos SSF em batelada com carga de 7,5, 10 e 15%, para o PSSF em batelada com carga de 20% e para os processo SSF em batelada alimentada com carga inicial de 10% e final de 10% com quatro alimentações (FB2), e carga inicial de 15 e final de 25 % (FB3).

De acordo com a Figura 16, é possível verificar que o processo SSF com carga de 10% foi o que apresentou maior rendimento de etanol em relação à quantidade total de bagaço *in natura* ($40 g_{Etanol}/Kg_{CAB}$). Dessa forma, esse processo foi o que apresentou melhor viabilidade frente à quantidade de matéria-prima.

Os processos SSF com carga de 7,5 e 15 %, foram os que apresentaram segundo maior e similar (com confiança de 95 %) $Y_{E/CAB}$ ($37 g_{Etanol}/Kg_{CAB}$), seguido dos processos em batelada alimentada (FB2 e FB3), que apresentaram similar valor (com confiança de 95 %) de $32 g_{Etanol}/Kg_{CAB}$, já o processo PSSF com carga de 20 % foi o que apresentou menor viabilidade frente à quantidade de matéria-prima, pois apresentou menor $Y_{E/CAB}$ ($27 g_{Etanol}/Kg_{CAB}$), de modo que apresentou uma baixa eficiência de produção de etanol frente à quantidade de celulose alimentada.

GUILHERME (2014) calculou o rendimento global em etanol para a produção de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) do bagaço de cana-de-açúcar pré-

tratado com ácido-álcali (H_2SO_4 seguido de NaOH) e a levedura utilizada foi *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907, sendo que o autor obteve um rendimento de $41,6 \text{ g}_{\text{Etanol}}/\text{Kg}_{\text{Biomassa não-tratada}}$, sendo esse rendimento próximo ao do processo SSF com carga de 10 % do presente estudo.

GURAGAIN *etal* (2014) também calculou o rendimento global em etanol para o processo de sacarificação e fermentação separadas (SHF) da palha de trigo pré-tratada com NaOH e a levedura utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae*. Dessa forma, o rendimento obtido foi de $120 \text{ g}_{\text{Etanol}}/\text{Kg}_{\text{Biomassa não-tratada}}$, sendo esse muito superior ao maior obtido no presente estudo ($40 \text{ g}_{\text{Etanol}}/\text{Kg}_{\text{CAB}}$), sendo que isso se deveu a elevada recuperação de sólidos após o pré-tratamento da palha de trigo (cerca de 58 %).

Dessa forma devem ser estudadas melhorias no processo de pré-tratamento ácido-álcali para uma aumentar a recuperação de CAB-OH sólido ao final mesmo, para que ocorra o aumento do rendimento do etanol em relação à quantidade de matéria-prima utilizada.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, o CAB-OH apresenta como um substrato promissor para a produção de etanol por processos SSF e PSSF, utilizando elevadas cargas de sólidos, em batelada e batelada alimentada.

O processo suplementado com apresentou maior produção de etanol (30 g/L), seguido de menores acúmulos de glicose e xilose, e não possuiu acúmulo de celobiose. Esse processo também apresentou maior $\% V_{\text{etanol}}/V_{\text{solução}}$ (3,73%) e maior eficiência (93%) em relação ao processo não suplementado. Dessa forma, foi justificada a necessidade de suplementação enzimática do meio SSF.

A pré-sacarificação não proporcionou um aumento na eficiência dos processos SSF, sendo que os parâmetros de produção máxima de etanol e eficiência foram similares para os processos PSSF e SSF nas cargas de 7,5 e 10%, porém o processo SSF foi superior ao PSSF quando foi utilizada a carga de 15 %, e o processo PSSF com carga de 20 % apresentou a menor eficiência (70 %) e o menor rendimento global em etanol (27 $\text{g}_{\text{Etanol}}/\text{Kg}_{\text{CAB}}$), porém apresentou a maior produção máxima de etanol para os processos em batelada (58 g/L), a qual foi similar a produção do processo SSF com carga de 15 %.

Entre todos os processos, em batelada e batelada alimentada, o que apresentou maior eficiência foi o SSF com carga de 10 % (98 %), sendo também o que apresentou maior rendimento de matéria-prima em etanol ($\text{g}_{\text{Etanol}}/\text{Kg}_{\text{CAB}}$), porém os processos em batelada alimentada apresentaram maior e similar produção de etanol do estudo: 68 g/L.

Entre os processos em batelada alimentada, o processo com carga inicial de 10 %, final de 20 % e quatro alimentações, com intervalo de 12 horas, apresentou o menor acúmulo de açúcares monoméricos (glicose e xilose), eficiência de 81 %, rendimento global em etanol de 32 $\text{g}_{\text{Etanol}}/\text{Kg}_{\text{CAB}}$, além de consumo enzimático similar ao processo SSF em batelada com carga de 10 %. Porém, o processo com carga inicial de 15 % e final de 25 %, apesar da menor eficiência de processo (64 %), apresentou a maior produtividade do estudo (2,4 g/L.h) e o mesmo rendimento global em etanol que o anterior e gasto enzimático similar ao processo SSF em batelada com carga de 15 %, sendo esse processo semi-contínuo com carga final de 25 % o que apresentou os melhores resultados do presente estudo.

A $\% V_{\text{etanol}}/V_{\text{solução}}$ mínima necessária para que a destilação do caldo fermentado seja viável economicamente é de 4%. Dessa forma, se baseando apenas nesse parâmetro, todos os processos em batelada e batelada alimentada são viáveis tecnicamente para

destilação, e os processos com carga de 7,5 %, apesar de apresentarem o segundo maior rendimento global em etanol ($37 \text{ g}_{\text{Etanol}}/\text{Kg}_{\text{CAB}}$), apresentaram uma concentração de etanol no meio fermentado abaixo de 4 %, sendo inviáveis para destilação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ASK, M.; OLOFSSON, K.; FELICE, T. D.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M.; LIDÉN, G.; OLSSON, L., Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated Arundo donax revealed by a comparison between SHF and SSF. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1452-1459, 2012.

AWAFO, V.A. **Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics.** 1997. 255 f.Tese de Doutorado. Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Canadá, 1997.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.

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

BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.;MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I., Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, v. 39,p. 1843–1848, 2004.

BARBOSA, M. M., **Obtenção de carotenóides e flavonóides a partir do bagaço do pedúnculo do caju por maceração enzimática.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2010.

BARROS, E. M.,**Isolamento e identificação de uma levedura obtida do suco de caju para a produção de etanol.** Trabalho de conclusão do curso de Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE. 2013.

BARROS, E. M.; RODRIGUES, T. H. S.; PINHEIRO, A. D. T.; ANGELIM, A. L.; MELO, V. M. M.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B.; A Yeast Isolated from Cashew Apple Juice and Its Ability to Produce First- and Second-Generation Ethanol. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 174, p. 2762–2776, 2014.

BASTOS, V. D. Etanol, álcool química e biorrefinarias. Rio de Janeiro: **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial**, n.25, p.5-38, 2007

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L., **Biochemistry**. 7ª edição. 2012. W. H. Freeman and Company. Nova York (Estados Unidos).

BHAT, M. K.; BHAT, S.; **Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications**. *Biotechnol. Adv.* **1997**, *15*, 583

BIODIESELBR, 2006. Pró-álcool-Programa Brasileiro de Álcool. Disponível em:<http://www.biodieselbr.com/proalcool/pro-alcool/programa-etanol.htm>
Acessado em maio de 2015.

BNDES. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável – Rio de Janeiro. 2008. 1ª Ed. 316 p.

BORGES, P. C. S., **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**. Tese de mestrado. Uberlândia-MG. 2008.

BOYLE, M; BARRON, N; MCHALE, A. P. Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Biotechnology Letter**, v.19, n.1, p.48-51, 1997.

BRADY D, NIGAM P, MARCHANT R, MCHALE AP Ethanol production at 45 °C by alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. **Bioproc Eng**, v.16, p.101–104, 1997.

BRETHAUTER, S.; WYMAN, C. E., Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production, **Bioresource Technology**, v. 10, n. 13, p. 4862-4874, 2010.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ I. C., Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives, **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754–4766, 2010.

CARVALHEIRO, F., DUARTE, L.C., GÍRIO, F.M., 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **J. Sci. Ind. Res**, v. 67, p. 849–864.

CARVALHO, M. L.; SOUSA JR., R.; RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F.; SUAREZ, C. A. G.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. C; GIORDANO, R. L. C.; Kinetic Study of the Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.30, n.3, p. 437-447, 2013.

CHEN, H.; HAN, Y.; XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. **Process Biochemistry**, v.43, p. 1462-1466, 2008.

CORREIA, J. A. C., **Estudo do pré-tratamento do bagaço de caju com peróxido de hidrogênio alcalino para a produção de etanol**. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia-Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE, 2013.

CORREIA, J. A. C.; MARQUES, J. E.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M.V.P, 2015. Enhanced enzymatic and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technol**, v. 179, p. 249-259.

CUEVAS, M.; SÁNCHEZ, S.; GARCÍA, J. F.; BAEZA, J.; PARRA, C.; FREER, J.; Enhanced ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of pretreated olive stones. **Renewable Energy**, v. 74, p.839-847, 2015.

CUNHA, R. C.; CASTRO, A.; ROBERTO, I. C.; Selection of a Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* Strain with Potential Application for Cellulosic Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 172, p. 1553–1564, 2014.

D'ALMEIDA, M. L. O. **Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: Celulose e papel – tecnologia de fabricação da pasta celulósica.** São Paulo: Senai/IPT, v.2, p.45- 106, 1988.

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

DEVANTIER, R.; PEDERSEN, S.; OLSSON, L., Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 68, p. 622–629, 2005.

DEKEN, R. H., The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. **J . gen. Microbiol**, v.44, p. 149-156, 1966.

DOWE, N.; MCMILLAN, J. SSF Experimental Protocols — Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation. **Laboratory Analytical Procedure (LAP) -Technical Report.** NREL/TP-510-42630, 2008.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K., The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential, **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 79, p. 339–354, 2008.

FREITAS, T. Brasil começa a produzir etanol de segunda geração. 2014. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2014/09/1521775-brasil-comeca-a-produzir-etanol-de-segunda-geracao.shtml>>. Acessado em junho de 2015.

GABHANE, J.; WILLIAM, S. P. M. P.; GADHE, A.; RATH, R.; VAIDYA, A. N.; WATE, S., Pretreatment of banana agricultural waste for bio-ethanol production: Individual and interactive effects of acid and alkali pretreatments with autoclaving, microwave heating and ultrasonication. **Waste Management**, v. 34, p. 498–503, 2014.

GALBE, M., ZACCHI, G., 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** v. 108, p. 41–65.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M., Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal Food Engineering**, v. 74, p. 78-88, 2006.

GHOSE, T. K., Measurement of cellulose activities (recommendation of commission on biotechnology IUPAC), **Pure Applied Chemistry**, v. 59, p.257-268, 1987.

GIESE, E. C.; PIEROZZI, M.; DUSSÁN, K. J.; SILVA, C.; SILVA, S. S., Enzymatic saccharification of acid-alkalipretreated sugarcane bagasse using commercial enzyme preparations. **Publicado online em Wiley Online Library**, 2012.

GUANZIROLI, C.E; SOUZA FILHO, H.M; VALENTE JUNIOR, A; BASCO, C A. Entraves ao Desenvolvimento da Cajucultura no Nordeste: Margens de Comercialização ou Aumentos de Produtividade e de Escala? Textos para discussão UFF/Economia - TD nº 250. 2008.

GUILHERME, A. A., **Estudo experimental e modelagem do processo desacarificação e fermentação simultânea utilizando bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol.** Tese de Doutorado em Engenharia Química. DEQ/Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal/RN, 2014.

GURAGAIN, Y. N.; GANESH, K. M.; BANSAL, S.; SATHISH, R. S., RAO, N.; VADLANI, P. V.; Low-lignin mutant biomass resources: Effect of compositional changes on ethanol yield. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 1–8, 2014.

GOSSELINK, R. J. A.; DE JONG, E.; GURAN, B.; ABÄCHERLI, A. Co-ordination network for lignin—standardisation, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN). **Industrial Crops and Products**, v.20, p.121-129, 2004.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN G., ZACCHI G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **TRENDS in Biotechnology**, v.24, p.549-556, 2006.

HAQUE, M. A.; BARMAN, D. N., KANG, T. H.; KIM, M. K.; KIM, J.; KIM, H.; YUN, H. D., Effect of dilute alkali pretreatment on structural features and enhanced enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* at boiling temperature with low residence time, **Biosystems Engineering**, v. 114 (3), p. 294-305, 2013.

HASUNUMA T.; KONDO A., Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains, **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1287–1294, 2012.

HENRISSAT, B. A.; **A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** *Biochem. J*, v. **280**, p. **309**, 1991.

HO, N. W. Y.; CHEN, Z.; BRAINARD, A. P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. **Applied Environment Microbiology**, v.64, n.5, p.1852–1859, 1998.

HOYER, K.; Galbe, M.; Zacchi, G, 2013. The effect of prehydrolysis and improved mixing on high-solids batchsimultaneous saccharification and fermentation of spruce to ethanol. **Process Biochemistry**, p. 48, 289–293.

KÁDÁR, Zs.; SZENGYEL, Zs.; RÉCZEY, K.; Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p.103–110, 2004.

KESHWANI, D. R. **Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual da Carolina do Norte, Carolina do Norte, Estados Unidos da América, 2009.

KIM, S.; PARK, J. M.; SEO, J. W.; KIM, C. H., Sequential acid-/alkali-pretreatment of empty palm fruit bunch fiber. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 229–233, 2012.

KLEMAN-LEYER, K. M.; SIIKA-AHO, M.; TEERI, T. T.; KIRK, T. K.; **The Cellulases Endoglucanase I and Cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* Act Synergistically To Solubilize Native Cotton Cellulose but Not To Decrease Its Molecular Size**. *App. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2883.

KÖTTER, P.; CIRIACY, M., Xilose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 776-783, 1993

KRISHNA, S. H.; REDDY, T. J.; CHOWDARY, G. V.; Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 193-196, 2001.

KUMAR, R., WYMAN, C.E., 2009. Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology? **Bioresour. Technol**,v. 100, p. 4193–4202.

LAMONATO, D. Pró-Álcool: de sua criação aos dias atuais. 2014. Disponível em: <<http://danilotlamonato.jusbrasil.com.br/artigos/120002732/pro-alcool-de-sua-criacao-aos-dias-atuais>>. Acessado em maio de 2015.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P., *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow, **Fungal Biology Reviews**, v. 24, p. 17–26, 2010.

LEÃO, R. M., AMORIM, H. V. Fermentação alcoólica, ciência e tecnologia. Piracicaba, Fermentec, 2005, p. 448.

LEE, C.; ZHENG, Y.; VANDERGHEYNST, J. S.; Effects of pretreatment conditions and post-pretreatment washing on ethanol production from dilute acid pretreated rice straw. **Biosystems Engineering**, v. 137, p. 36-42, 2015a.

LEE, D.; OWENS, V. N.; BOE, A.; JERANYAMA, P. **Composition of herbaceous biomass feedstocks**. South Dakota State University Publication, 2007.

LEE, J. W.; KIM, J. I.; JANG, H. M.; LEE, M. W.; PARK, J. M., Sequential dilute acid and alkali pretreatment of corn stover: Sugar recovery efficiency and structural characterization. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 296–301, 2015b.

LEE, J.Y.; LI, P.; LEE, J.; RYU, H.J.; OH, K.K.; Ethanol production from *Saccharina japonica* using an optimized extremely low acid pretreatment followed by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**. v.127, p.119–125, 2013.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L. e COX, M. M. Princípio de bioquímica. Traduzido por SIMÕES, A. A.; LODE, W. R. N. São Paulo: Ed. Sarvier. 6ª edição, p. 522-525. Tradução de: *Principles of biochemistry*, 2013.

LEITÃO, R. C.; CLAUDINO, R. L.; BRITO, C. R. F.; ALEXANDRE, L. C.; CASSALES, A. R.; PINTO, G. A. S.; SANTAELLA, S. T., Produção de Biogás a partir do Bagaço do caju, **Embrapa Agroindústria Tropical**, ISSN 1679-6543, 2011.

LI, J.; LIN, J.; ZHOU, P.; WU, K.; LIU, H.; XIONG, C.; GONG, Y.; XIAO, W.; LIU, Z., One-pot simultaneous saccharification and fermentation: A preliminary study of a novel configuration for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 171–178, 2014.

LIMA, J. R., Hambúrguer de Caju: Elaboração e Características, Comunicado técnico 131 – **Embrapa Agroindústria Tropical**, ISSN 1679-6535, 2007.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.). Processos Fermentativos e Enzimáticos. **Biotechnologia Industrial**, São Paulo: Edgard Blücher, v. 3, p.1-43.

LIMA, G. A. S., Panorama sobre a cajucultura no Ceará. 2013. CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_20_14_51_36_panorama_da_cajucultura_no_ceara_2013.pdf>

LIN, Y. S.; LEE, W. C.; DUAN, K. J.; LIN, Y. H., Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation in rotary drum reactor using thermotolerant *Kluveromyces marxianus*. **Applied Energy**, v. 105, p. 389–394, 2013.

LIU, K.; LIN, X.; YUE, J.; LI, X.; ZHU, M.; LIN, XIAO, L., High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4952–4958, 2010.

LU, X.B., ZHANG, Y.M., YANG, J., LIANG, Y., Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. **Chem. Eng. Technol**, v. 30, p. 938–944, 2007

LYND, L. R.; ZHANG, Y.; Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach **Biotechnol. Bioeng**, v.77, p. 467, 2002.

MACHADO, C. M. M. Produção de biocombustíveis por microrganismos, 2010. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2009/producao-de-biocombustiveis-pormicrorganismos>>. Acessado em maio de 2015.

MATIAS, M. F. O.; OLIVEIRA, E. L.; GERTRUDES, E.; MAGALHÃES, M. M. A., Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale*, L.) and guava (*Psidium guajava*) fruits for enrichment of food products. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 48, p. 143-150, 2005.

MATOSO, F.; AMATO, F., Mistura de etanol na gasolina sobe para 27% a partir de 16 de março. 2015, Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/noticia/2015/03/mistura-de-etanol-na-gasolina-sobe-para-27-partir-de-16-de-marco.htm>>. Acessado em Junho de 2015.

MATSUSHIKA, A.; HIROYUKI, I.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S., Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 84, p. 37–53, 2009

MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S., Efficient Bioethanol Production from Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Requires High Activity of Xylose Reductase and Moderate Xylulokinase Activity. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 106, p. 306–309, 2008.

MARTINS, D. B.; DE SOUZA, C. G. J. R.; SIMOES, D. A.; DE MORAIS, M. A. Jr. The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose. **Curr Microbiol**, v.44, p.379.382, 2002.

MARTINS, L. F.; KOLLING D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P., Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1417–1424, 2008.

MCINTOSH, S.; VANCOV, T., Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment, **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6718–6727, 2010.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORENO, A. D.; IBARRA, D.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, M., Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase, **Bioresource Technology**, v. 135, p. 239–245, 2013.

MUSSATTO, S.I., FERNANDES, M., MILAGRES, A.M.F., ROBERTO, I.C., Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme Microb. Technol**, v. 43, p. 124–129, 2008.

OBEROI, H. S.; BABBAR, N.; SANDHU, S. K.; DHALIWAL, S. S.; KAUR, U.; CHADHA, B. S.; BHARGAV, V. K., Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous

saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 39, p. 557–566, 2012.

ÖGREN, K.; VEHEMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, M.; GALBE, M.; VIKARI, L.; ZACCHI, G., High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated cornstover for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 607–613, 2007.

OLIVEIRA, V. H., Cajucultura. **Ver. Bras. Frutic.** Vol30.no.I. Jaboticabal Mar. 2008.

OLIVEIRA, D.W.F. ; SOUSA, J.R. ; FRANÇA, I.W.L. ; FELIX, A.K.N. ; MARTINS, J.J.L. ; GONÇALVES, L.R.B. Kinetic Study of Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in Clarified Cashew Apple Juice. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 421-422, 2010.

OLSSON, L., HAHN-HÄGERDAL, B.: Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates for ethanol production. **Enzyme Microb Technol**, v. 18, p.312-331, 1996.

PACHECO, A.M.; GONDIM, D. R.; GONÇALVES, L.R.B. Ethanol Production by Fermentation Using Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* in Cashew Apple Bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 209-217, 2010.

PALMIQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition. **Bioresour. Technol.** v. 74, p. 25–33.

PAULOVÁ, L.; PATÁKOVÁ, P.; RYCHTERA, M.; MELZUCH., High solid fed-batch SSF with delayed inoculation for improved production of bioethanol from wheat straw. **Fuel**, v. 122, p. 294–300, 2014.

PERSSON, P.; ANDERSON, J.; GORTON, L.; LARSSON, S.; NILVEBRANT, N.; JÖNSSON, L. J. Effect of different forms of alkali treatment on specific fermentation inhibitors and on the fermentability of lignocellulose hydrolysates for production of fuel ethanol. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.5318-5325, 2002.

PESSANI, N. K.; ATIYEH, H. K.; WILKINS, M. R.; BELLMER, D. D.; BANAT, I. M., Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: The effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10618–10624, 2011.

PINHEIRO, A. D. T. ; BARROS, E. M. ; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B., Modeling and optimization of the effect of initial substrate concentration on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using cashew apple juice as carbon source. In: **34th SBFC**, 2012, New Orleans. Proceeding of the 34th SBFC, 2012. v. 1. p. 1-1

PINHEIRO, A.D.T.; **Fermentação alcoólica do suco de caju (*Anacardium Occidentale* L.): influência de condições operacionais**.105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2011.

PINHEIRO, A. D. T.; ROCHA, M. V. P.; MACEDO, G. R.; e GONÇALVES, L. R. B. Evaluation of cashew apple juice for the production of fuel ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.148, p.227-234, 2008.

ROCHA, M. V. P.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA, M. C. M.; GONÇALVES, L. R.B. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.22, p.1295-1299, 2006.

ROCHA, M. V. P., RODRIGUES, T., H. S., MACEDO, G. R., GONÇALVES, L. R. B. Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Pretreated Cashew Apple Bagasse with Alkali and Diluted Sulfuric Acid for Bioethanol Production. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v.155, p.407–417, 2009.

ROCHA, M. V. P. **Produção de bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale L.*) por fermentação submersa**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.2010.

RODRIGUES, C. A.; HAVEN, M. A.; LINDEMAN, J.; FELBY, C.; GAMA, M., Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification /fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. **Enzyme and Microbial Technology**, 2015.

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

RODRIGUES, T. H. S.; DANTAS, M. A. A.; PINTO, G. A. S.; GONCALVES, L. R. B., Tannase Production by Solid State Fermentation of Cashew Apple Bagasse, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, p. 675 – 688, 2007.

RODRIGUES, T. H. S.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B., Effects of inoculum concentration, temperature, and carbon sources on tannase production during solid state fermentation of cashew apple bagasse. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, p. 571-576, 2008.

RODRIGUES T.H.S.; ROCHA M.V.P.; MACEDO G.R.; GONÇALVES, L.R.B., Ethanol production from cashew apple bagasse: improvement of enzymatic hydrolysis by microwave-assisted alkali pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, p. 929–943, 2011.

ROSA, F. M.; SA-CORREIA, I., Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 23–27, 1992.

RUDOLF, A.; ALKASRAWI, M.; ZACCHI, G.; LÍDEN, G., A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p.195–204, 2005.

RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; GONÇALVES, A. R.; TEIXEIRA, J. A., An alternative application to the Portuguese agro-industrial residue: wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, p. 85-96, 2008.

RYDLEWSKY, C.; 2015. O maior Startup do Brasil. Disponível em: <<http://epocanegocios.globo.com/Informacao/Visao/noticia/2015/04/maior-startup-dobrasil.html>>. Acessado em maio de 2015.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Microbiol. Biotechnol.**, v.30, p.279-291, 2003.

SAHA, B. C., COTTA, M. A. Ethanol Production from Alkaline Peroxide Pretreated Enzymatically Saccharified Wheat Straw. **Biotechnology Progress**, v.22, p.449-453, 2006.

SANTOS, 2002. Álcool gel: a revolução. Disponível em: <http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/20020409/89_90.asp>. Acessado em maio de 2015.

SANTOS, E., 2014. Usina cariri inicia os trabalhos de reativação. Disponível em: <<http://diariodonordeste.verdesmares.com.br/cadernos/negocios/usina-cariri-inicia-os-trabalhos-de-reativacao-1.1158842>>. Acessado em maio de 2015.

SANTOS, E., 2015. Ceará retoma a produção de álcool em duas usinas. Disponível em: <<http://diariodonordeste.verdesmares.com.br/suplementos/cariri-regional/ceara-retoma-producao-de-alcool-em-duas-usinas-1.1225884>>. Acessado em maio de 2015.

SANTOS, S. F. M., Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato, Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, 2007.

SCHMIDELL, W; BONOMI, A. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E; Borzani, W. (coord). **Biociencia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v. 2. p.123-178.

SELIG, M.; WEISS, N.; JI Y. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass, **Laboratory Analytical Procedure (LAP)** - Technical Report, NREL/TP-510-42629, 2008.

SILVA, C. G.; GRELIER, S.; PICHAVANT, F.; FROLLINI, E.; CASTELLAN, A. Adding value to lignins isolated from sugarcane bagasse and Miscanthus. **Industrial Crops and Products**, v.42, p. 87– 95, 2013.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Quim. Nova**, v. 32, p. 661-671, 2009.

SÍNTESE conjuntural da safra de castanha-de-caju 2010/2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10_10_25_12_32_12_dados_conjunturais_setembro_2010.pdf>. Acesso em maio de 2015.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER D., Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, **Laboratory Analytical Procedure (LAP)** - Technical Report, NREL/TP-510-42618, 2008a.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D., Determination of Extractives in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)** - Technical Report, NREL/TP-510-42619, 2008b.

SULDOPIAUI, 2015. Pouca chuva compromete safra de caju. Disponível em: <www.suldopiaui.com/portal/noticias/piaui/12,6499,pouca-chuva-compromete-safra-de-caju-no-piaui-e-ceara-.html#.VXiOIM9Viko>. Acessado em junho de 2015

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v.56, p.195–204, 2004

SUN, Y., CHENG, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour. Technol.** v. 83, p. 1–11.

SURYAWATI, L.; WILKINS, M.R.; BELLMER, D.B.; HUHNKE, R.L.; MANESS, N.O.; BANAT, I.M., Simultaneous Saccharification and Fermentation of Kanlow Switchgrass Pretreated by Hydrothermolysis Using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, No. 5, 2008.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K., Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621–1651, 2008.

TEIXEIRA, F.C., 2005. A geopolítica mundial do petróleo. Disponível em: <http://www.fup.org.br/plebiscito/geopolitica_mundial%20.htm>. Acessado em junho de 2015.

TEIXEIRENSE, M., 2015. Conjuntura mensal da castanha de caju. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_05_15_18_01_13_castanhadecaju_abril.pdf>. Acessado em maio de 2015.

UDOP, 2015. Produção de etanol deve atingir recorde em 2014/2015. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1121859>>. Acessado em maio de 2015

UNICA, 2015. A sustentabilidade no setor sucroenergético brasileiro. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/sustentabilidade/>>. Acessado em maio de 2015.

VANDERGHEM, C.; RICHEL, A.; JACQUET, N.; BLECKER, C.; PAQUOT, M. Impact of formic/acetic acid and ammonia pre-treatments on chemical structure and physico-chemical properties of *Miscanthus giganteus* lignin. **Polymer Degradation and Stability**, v.96, p. 1761–1770, 2011.

VIEIRA, C., 2014. Usina em Alagoas começa a produzir o etanol de segunda geração. 2014. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2014/12/usina-em-alagoas-comeca-produzir-o-etanol-de-segunda-geracao.html>>. Acessado em maio de 2015.

WANDERLEY, M. C. A.; MARTIN, C.; ROCHA, G. J. M.; GOUVEIA, E. R., Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 448–453, 2013.

WILKINS, M. R.; MUELLER, M.; EICHLING, S.; BANAT, I. M. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v.43, p.346-350, 2008.

WINGREN, A., GALBE, M., ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnol. Progr**, v. 19, p. 1109–1117, 2003.

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

YABLOCHKOVA, E. N.; BOLOTNIKOVA, O. I.; MIKHAILOVA, N. P.; NEMOVA, N. N.; GINAK, A. I. Specific Features of Fermentation of D-Xylose and D-Glucose by Xylose-Assimilating Yeasts. **Appl Biochem Microbiol**, v.39, p.265–269, 2003.

YABLOCHKOVA, E. N.; BOLOTNIKOVA, O. I.; MIKHAILOVA, N. P.; NEMOVA, N. N.; GINAK, A. I. The Activity of Key Enzymes in Xylose-Assimilating Yeasts at Different Rates of Oxygen Transfer to the Fermentation Medium. **Microbiol**, v.73, p.129–133, 2004.

YANG, B., WYMAN, C.E., Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels Bioprod**, v. 2, p. 26–40, 2008.

YANG M, LI W, LIU B, LI Q, XING J. High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process. **Bioresource Technol**, v. 101, p. 4884–8, 2010.

ZAFAR, S.; OWAIS, M., Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. **Biochemical Engineering Journal**, v.27, 295–298, 2006.

ZHANG M. J.; WANG, F.; SU, R. X.; QI, W.; HE, Z. M., Ethanol production from high dry matter corncob using feed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. **Bioresour Technol**, v. 101, p. 4959–64, 2010.

ZHANG, K.; CHANG, J.; GUAN, Y.; CHEN, H.; YANG, Y.; JIANG, J. Lignocellulosic biomass gasification technology in China. **Renewable Energy**, v.49, p.175-184, 2013.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R., Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnol. Bioeng**, v. 88, p. 797, 2004.

ZHAO, X.; ELLISTON, A.; COLLINS, S. R. A.; MOATES, G. K.; COLEMAN, M. J.; WALDRON, K. W.; Enzymatic saccharification of duckweed (*Lemna minor*) biomass without thermophysical pretreatment. **Biomassa and Bioengineering**, v. 47, p. 354-361, 2012.

ZHAO, X.; MOATES, K.; ELLISTON, A.; WILSON, D. R.; COLEMAN, M. J. WALDRON, K. W., Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded duckweed: Improvement of the ethanol yield by increasing yeast titre, **Bioresource Technology**, 2015.