UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MATEUS ZANON ANDREATTA CALLEGARI

CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DA VARIEDADE VERTIX 11 DE CANA ENERGIA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

CURITIBA

2025

MATEUS ZANON ANDREATTA CALLEGARI

CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DA VARIEDADE VERTIX 11 DE CANA ENERGIA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Engenharia Química – PPGEQ, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos
Coorientadores Prof. Dr. Arion Zandoná Filho e Dr. Thiago Alessandre da Silva

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Callegari, Mateus Zanon Andreatta
Caracterização do potencial da variedade vertix 11 de cana energia para a produção de etanol de segunda geração. / Mateus Zanon Andreatta Callegari. – Curitiba, 2025.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos
Coorientador: Dr. Arion Zandoná Filho
Coorientador: Dr. Thiago Alessandre da Silva

1. Biomassa lignocelulósica. 2. Vapor. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Ramos, Luiz Pereira. IV. Zandoná Filho, Arion. V. Silva, Thiago Alessandre da.VI. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

ATA Nº193

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA

No dia vinte e oito de março de dois mil e vinte e cinco às 09:30 horas, na sala Miniauditório, Prédio da Engenharia Química no Centro Politécnico, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **MATEUS ZANON ANDREATTA CALLEGARI**, intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DA VARIEDADE VERTIX 11 DE CANA ENERGIA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ARION ZANDONÁ FILHO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), SUSAN GRACE KARP (DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - UFPR), MARCOS LÚCIO CORAZZA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ARION ZANDONÁ FILHO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 28 de Março de 2025.

Assinatura Eletrônica
28/03/2025 13:19:48.0
ARION ZANDONÁ FILHO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
03/04/2025 09:58:12.0
SUSAN GRACE KARP
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - UFPR)

Assinatura Eletrônica
03/04/2025 11:41:59.0
MARCOS LÚCIO CORAZZA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 436717
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 436717

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MATEUS ZANON ANDREATTA CALLEGARI**, intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DA VARIEDADE VERTIX 11 DE CANA ENERGIA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Março de 2025.

Assinatura Eletrônica
28/03/2025 13:19:48.0
ARION ZANDONÁ FILHO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
03/04/2025 09:58:12.0
SUSAN GRACE KARP
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - UFPR)

Assinatura Eletrônica
03/04/2025 11:41:59.0
MARCOS LÚCIO CORAZZA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 436717
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 436717

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a mim mesmo, pela resiliência que me permitiu superar desafios que extrapolaram o campo acadêmico. Em meio a dificuldades que deveriam ser alheias ao ambiente científico, encontrei na ciência minha fortaleza e na perseverança minha maior aliada. Que este trabalho simbolize a vitória da integridade sobre a adversidade e sirva de inspiração para aqueles que, diante de obstáculos, se recusam a desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Oxalá e aos meus guias espirituais da Umbanda, cuja luz e proteção foram fundamentais ao longo desta jornada. Em cada desafio, foi neles que encontrei a força necessária para persistir, a fé para seguir adiante e a sabedoria para discernir o caminho correto.

À minha mãe, Gisele Andreatta, expresso minha mais profunda gratidão pelo amor incondicional, pelo carinho e pelos ensinamentos que me moldaram como ser humano e profissional. Seu apoio constante, sua dedicação incansável e sua crença irrestrita em minha capacidade foram a base sobre a qual edifiquei cada conquista.

Ao meu marido, Vinícius Antonio Zanon Andreatta Callegari, cuja excelência como perito psicólogo forense reflete não apenas sua competência profissional, mas também sua inteligência e sensibilidade, dedico um agradecimento especial. Sua crença inabalável em mim, seu apoio incansável nos momentos mais difíceis e sua paciência diante das minhas incertezas foram fundamentais para que eu pudesse concluir este projeto.

Aos meus irmãos, Lucas e Bruno, agradeço pelo companheirismo e pelos conselhos que sempre me ofereceram com generosidade. Sua presença foi um alívio e uma fortaleza, proporcionando-me momentos de leveza e reflexão que foram essenciais para atravessar os desafios que esta trajetória me impôs.

Aos meus coorientadores, Dr. Arion Zandoná Filho e Dr. Thiago Alessandre Silva, expresso minha sincera gratidão por toda dedicação, paciência e amizade ao longo desta jornada. Em especial, ao Dr. Arion Zandoná Filho, agradeço imensamente por sua colaboração única e formidável neste projeto, demonstrando não apenas excelência acadêmica, mas também um profundo senso de compaixão e empatia que foram inestimáveis para mim.

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná, manifesto meu reconhecimento pelo ensino de qualidade e pelo compromisso com a formação acadêmica de excelência.

Ao CNPq e à GranBio, agradeço pelo apoio financeiro e pelas bolsas de estudo, que possibilitaram a execução deste projeto e viabilizaram a concretização de minha pesquisa.

Por fim, estendo meus agradecimentos a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A produção de etanol celulósico a partir de resíduos agrícolas agroindustriais, bem como o crescente interesse no uso de biomassa lignocelulósica, tornaram-se temas estratégicos para a indústria sucroalcooleira. Nesse contexto, a cana energia surgiu como uma alternativa promissora para aumentar a produtividade de biomassa no campo e gerar plantas com maior quantidade de fibras sem comprometer a produção de sacarose. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da cana energia da variedade Vertix 11, utilizando o reaproveitamento do licor hemicelulósico oriundo do pré-tratamento por explosão a vapor, para o desenvolvimento de uma biorrefinaria baseada na produção de etanol de segunda geração. Para isso, amostras de biomassa foram submetidas às etapas de caracterização, pré-tratamento por explosão a vapor, hidrólise enzimática e fermentação dos hidrolisados a etanol. Algumas amostras foram inicialmente lavadas com água em um teor de sólidos de 2% ($m \cdot v^{-1}$) a 50 °C por 1 h para analisar a remoção de açúcares residuais. Posteriormente, essas amostras foram caracterizadas de acordo com procedimentos analíticos padronizados para a análise de gramíneas e os resultados indicaram que a lavagem não alterou a composição química da biomassa. Os ensaios de explosão a vapor foram realizados a 195°C por 7,5 min em condições de auto-hidrólise (ausência de catalisador exógeno). As frações sólidas e líquidas derivadas do pré-tratamento foram caracterizadas de modo a avaliar o seu efeito sobre a composição química das biomassas e determinar os rendimentos mássicos do processo (base seca). A recuperação mássica obtida foi de 87,0% para ambas amostras Vertix 11 (lavadas e não lavadas). A explosão a vapor promoveu a remoção seletiva das hemiceluloses, que foram parcialmente recuperadas na fração líquida, também denominada de licor de pré-tratamento. A análise cromatográfica desta fração demonstrou a presença de xilo-oligossacarídeos. Os substratos pré-tratados foram lavados com água a 5% de sólidos para separação do licor de pré-tratamento, também chamado hidrolisado hemicelulósico ou fração C5. Posteriormente, foram realizados ensaios de hidrólise enzimática em frascos agitados, utilizando a enzima Cellic CTec3 (Novozymes) como base, com variações que incluíram a presença ou ausência da enzima Cellic HTec3 (Novozymes) e, em determinadas condições, também a adição do licor proveniente do pré-tratamento.Foram empregados 15% de sólidos insolúveis em água e carga enzimática de 60 $mg \cdot g^{-1}$ de enzima Cellic CTec3 e 6 $mg \cdot g^{-1}$ de enzima Cellic HTec3 por grama de material seco. A melhor concentração em teor de glucose após 96 h de hidrólise foi de 87,9 $g \cdot L^{-1}$ para as amostra Vertix 11 contendo a fração C5 e com adição de ambas as enzimas. O hidrolisado enzimático com maior concentração de acúcares totais (xilose mais glucose) foi, também, da amostra Vertix 11 contendo a fração C5 e com adição de ambas as enzimas. Todas as amostras foram fermentadas com a levedura Celere-2L. Os ensaios de fermentação foram conduzidos em incubadora de agitação orbital por 24 h a 32°C. Os títulos de etanol obtidos foram de 31,0, 31,8, 43,0 e 47,5 $g \cdot L^{-1}$ para os hidrolisados Vertix 11 $C^{6}_{CTec/HTec}$, C^{6}_{CTec}, $C^{6/5}_{CTec}$ e $C^{6/5}_{CTec/HTec}$, respectivamente, com rendimentos de etanol de 82,2%, 87,9%, 97,8 e 97,7%. A amostra Vertix 11 $C^{6/5}_{CTec/HTec}$ foi a que apresentou o melhor desempenho, indicando um potencial de produção de 13.304 $L \cdot ha^{-1}$ de etanol celulósico, em contraste com os 5.655 $L \cdot ha^{-1}$ da cana-de-açúcar tradicional.

Palavras-chave: explosão a vapor; biomassa lignocelulósica; caracterização química; fração C5.

ABSTRACT

The production of cellulosic ethanol from agricultural and agro-industrial residues, along with the growing interest in the use of lignocellulosic biomass, has become a strategic topic for the sugar-energy industry. In this context, energy cane has emerged as a promising alternative to increase biomass productivity in the field while generating plants with higher fiber content without compromising sucrose production. This study aimed to evaluate the potential of energy cane variety Vertix 11, utilizing the reutilization of hemicellulosic liquor derived from steam explosion pretreatment, for the development of a biorefinery focused on second-generation ethanol production. Biomass samples underwent characterization, steam explosion pretreatment, enzymatic hydrolysis, and fermentation of hydrolysates to ethanol. Some samples were initially washed with water at 50°C for 1 hour with a solid content of 2% (m/v) to analyze residual sugar removal. These samples were then characterized using standardized analytical procedures for grass analysis, and results indicated no changes in biomass composition due to washing. Steam explosion assays were conducted at 195°C for 7.5 minutes under auto-hydrolysis conditions (without exogenous catalysts). The solid and liquid fractions derived from pretreatment were analyzed to assess their impact on biomass composition and determine mass yields (dry basis). The mass recovery obtained was 87.0% for both washed and unwashed Vertix 11 samples. Steam explosion selectively removed hemicelluloses, which were partially recovered in the liquid fraction, also referred to as pretreatment liquor. Chromatographic analysis of this fraction revealed the presence of xylo-oligosaccharides. Pre-treated substrates were washed with water at 5% solids to separate the pretreatment liquor, also known as hemicellulosic hydrolysate or C5 fraction. Subsequently, enzymatic hydrolysis assays were carried out in shaken flasks using the Cellic CTec3 enzyme (Novozymes) as a base, with variations including the presence or absence of the Cellic HTec3 enzyme (Novozymes) and, under certain conditions, the addition of the liquor derived from the pretreatment process.The enzymatic load consisted of 60 $mg \cdot g^{-1}$ of Cellic CTec3 and 6 $mg \cdot g^{-1}$ of Cellic HTec3 per gram of dry material with 15% insoluble solids in water. The highest glucose concentration after 96 hours of hydrolysis was 87.9 $g \cdot L^{-1}$ in the Vertix 11 sample containing the C5 fraction and both enzymes. The enzymatic hydrolysate with the highest total sugar concentration (xylose plus glucose) was also obtained from the same experimental condition. All samples were fermented using the Celere-2L yeast strain in an orbital shaker incubator at 32°C for 24 hours. Ethanol titers obtained were 31.0, 31.8, 43.0, and 47.5 $g \cdot L^{-1}$ for the hydrolysates Vertix 11 $C^{6}_{CTec/HTec}$, C^{6}_{CTec}, $C^{6/5}_{CTec}$, and $C^{6/5}_{CTec/HTec}$, respectively, with ethanol yields of 82.2%, 87.9%, 97.8%, and 97.7%. The Vertix 11 $C^{6/5}_{CTec/HTec}$ sample showed the best performance, indicating a potential production of 13,304 $L \cdot ha^{-1}$ of cellulosic ethanol, compared to 5,655 $L \cdot ha^{-1}$ for conventional sugarcane.

Key-words: steam explosion; lignocellulosic biomass; chemical characterization; C5 stream.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição dos custos totais de produção de E1G e E2G.....25
Figura 2 - Estrutura da biomassa lignocelulósica.....27
Figura 3 - Estrutura da celulose, evidenciando a celobiose como sua unidade conformacional básica, bem como a formação de ligações de hidrogênio intra (em azul) e intermoleculares (em vermelho).....29
Figura 4 – Representação das fórmulas estruturais das unidades monoméricas mais encontradas nas hemiceluloses: (A1) D-xilose, (A2) L-arabinose, (B1) D-glucose, (B2) D-galactose, (C1) ácido-D-glucurônico e (C2) ácido 4-O-metil-D-glucurônico.....30
Figura 5 - Estrutura geral ilustrando as ramificações que podem ser encontradas em diversas xilanas isoladas da parede celular de plantas.....31
Figura 6 - Principais unidades presentes na lignina.....32
Figura 7 - Estrutura-modelo de uma lignina e suas principais ligações químicas.....34
Figura 8 - Configuração de reatores para o pré-tratamento por explosão a vapor de biomassa: (a) - Reator em batelada, (b) - Reator contínuo.....39
Figura 9 - Modo de ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico.....41
Figura 10 - Configurações disponíveis para o processamento da biomassa lignocelulósica 47
Figura 11 - Principais etapas do projeto proposto para a obtenção de etanol celulósico a partir da biomassa de cana energia Vertix 11.....52
Figura 12 - Instalações do reator de explosão a vapor no NPDEAS (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável) da Universidade Federal do Paraná.....57
Figura 13 - Recuperação mássica das amostras após pré-tratamento por explosão a vapor realizada a 195°C e 7,5 min.....67
Figura 14 - Perfil cromatográfico de carboidratos (hidrólise parcial) e ácidos orgânicos das frações solúveis em água obtidas após pré-tratamento por explosão a vapor de amostras de cana energia.....69
Figura 15 - Perfil cromatográfico após análise por HPLC das frações solúveis obtidas após o pré- tratamento (auto-hidrólise), após procedimento de pós-hidrólise.....70

Figura 16 - Perfil cromatográfico de compostos furânicos das frações solúveis em água obtidas após pré-tratamento por explosão a vapor de amostras de cana energia.....71
Figura 17 - Recuperação de glucanas nas frações sólida e líquida para a explosão a vapor a 195°C por 7,5 min das biomassas de cana energia.....74
Figura 18 - Recuperação de xilanas nas frações sólida e líquida para a explosão a vapor a 195°C por 7,5 min das biomassas de cana energia.....74
Figura 19 – Liberação de glucose a partir de hidróilise enzimática da biomassa de Vertix 11 explodida a vapor para experimentos realizados a 15% ($m \cdot V^{-1}$) WIS com 60 mg de Cellic CTec3 mais 6 mg de Cillec HTec3 por grama de biomassa seca.....76
Figura 20 - Liberação de xilose a partir de hidrólise enzimática da biomassa de Vertix 11 explodida a vapor para experimentos realizados a 15% ($m \cdot V^{-1}$) WIS com 60 mg de Cellic CTec3 mais 6 mg de Cellic HTec por grama de biomassa seca.....77
Figura 21 - Liberação de glucose mais xilose a partir de hidrólise enzimática da biomassa de Vertix 11 explodida a vapor para experimentos realizados a 15% ($m \cdot V^{-1}$) WIS com 60 mg de Cellic CTec3 mais 6 mg de Cellic HTec por grama de biomassa seca.....78
Figura 22 – Produção de E2G a partir do pré-tratamento a vapor, hidrólise enzimática e fermentação das amostras Vertix 11.....88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre os parâmetros agronômicos da cana-de-açúcar e a cana energia.....13
Tabela 2 – Atividade e produção de plantas comerciais de E2G no mundo.....22
Tabela 3 - Principais técnicas de pré-tratamento para biomassas lignocelulósicas.....37
Tabela 4 – Configuração das amostras submetidas a etapa de hidrólise enzimática..60
Tabela 5 - Composição química da biomassa de cana energia e do bagaço de cana-de-açúcar convencional antes da explosão a vapor.....64
Tabela 6 - Composição química da fração sólida da biomassa de cana energia e do bagaço de cana-de-açúcar convencional após explosão a vapor.....68
Tabela 7 - Açúcares monoméricos presentes antes e após o tratamento de pós-hidrólise.....72
Tabela 8 - Recuperação mássica dos componentes presentes nas frações sólida e líquida após pré-tratamento a vapor.....73
Tabela 9 – Ajuste matemático e coeficiente de determinação (R^2) referentes à liberação de glucose dos hidrolisados enzimáticos.....76
Tabela 10 – Ajuste matemático e coeficiente de determinação (R^2) referentes à liberação de xilose dos hidrolisados enzimáticos.....77
Tabela 11 – Parâmetros de fermentação para as amostras Vertix 11 C^{6}_{CTec}, $C^{6/5}_{CTec/HTec}$ e $C^{6/5}_{CTec/HTec}$* utilizando Celere-2L como o organismo fermentador.....82
Tabela 12 – Concentração de HMF e furfural antes (inicial) e depois (final) do processo de remoção em rota-evapordor.....83
Tabela 13 – Parâmetros de fermentação para as amostras hidrolisadas Vertix 11 utilizando Celere-2L como organismo fermentador.....84

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AFEX	Explosão a vapor com amônia líquida
AnAra	Anidroarabionose
AnGlc	Anidroglucose
AnXyl	Anidroxilose
C5	Fração de pentoses
C6	Fração de hexoses
CBH	Celobioidrolase
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COP21	Conferência das nações unidas
CP	Passo ótico
D	Diluição
E1G	Etanol de primeira geração
E2G	Etanol celulósico ou de segunda geração
Ef	Rendimento de fermentação
EG	Endoglucanase
Ɛ	Absorvidade molar
FPU	Unidades de papel filtro
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
G	Unidades guaiacila da estrutura de ligninas
°GL	Grau Gay-Lussac
Glc	Glucose
EqGlc	Equivalentes de glucose
GP	Grau de polimerização
H	Unidades p-hidroxifelina da estrutura de ligninas
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia a líquida de alta eficiência
IEA	Agência Internacional de Energia
LIA	Lignina insolúvel em ácido
LPMOs	Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos
LSA	Lignina solúvel em ácido

NPDEAS	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável
NREL	Laboratório Nacional de Energias Renováveis
RenovaBio	Política Nacional de Energias Renováveis
Rm	Rendimento mássico da fração sólida recuperada da explosão a vapor
So	Fator de severidade da explosão a vapor
S	Unidades siringila da estrutura de ligninas
SHCF	Hidrólise Enzimática Separada e Cofermentação
SHF	Hidrólize Enzimática Separada e Fermentação
SPORL	Pré-tratamento com sulfito para superar a recalcitrância da lignocelulose
SSCF	Sacarificação e Cofermentação Simultâneas
SSF	Sacarificação e Fermentação Simultâneas
WIS	Water-Insoluble Solids

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS 7

LISTA DE TABELAS 9

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS 10

1 INTRODUÇÃO 9

2 OBJETIVOS 11

2.1 OBJETIVO GERAL 11

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 11

3 REFERENCIAL TEÓRICO 12

3.1 CANA-DE-AÇÚCAR E CANA ENERGIA 12

3.2 ETANOL CELULÓSICO OU ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (E2G) 15

3.3 CENÁRIO ATUAL DE E2G 17

3.3.1 Descarbonização e seu auxílio na ambição climática do Brasil 18

3.3.2 Biorrefinarias e valorização 20

3.3.3 Principais projetos em curso no Brasil e no mundo 22

3.3.4 Estimativa de custos e perspectiva de evolução 24

3.3.5 Redução de custos e pontos de melhoria 25

3.4 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA 26

3.5 CELULOSE 28

3.6 HEMICELULOSES 29

3.7 LIGNINA 32

3.8 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA 35

3.9 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA 40

3.9.1 Enzimas utilizadas e sua ação sinérgica 40

3.9.2 Etapas de reação e fatores que afetam a hidrólise enzimática 42
3.9.3 Estratégias de otimização da hidrólize enzimática 45
4 PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS 46
4.1 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS 48
5 MATERIAL E MÉTODOS 51
5.1 PRINCIPAIS ETAPAS DO TRABALHO 51
5.2 MATERIAL 51
5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA 53
5.3.1 Lavagem do material 53
5.3.2 Determinação de umidade 53
5.3.3 Determinação das cinzas 54
5.3.4 Determinação dos extrativos 54
5.3.5 Determinação de carboidratos e lignina 55
5.4 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA 56
5.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS 59
5.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA 59
5.7 FERMENTAÇÃO 61
5.7.1 Preparação do meio de cultura 61
5.7.2 Ensaios de fermentação 61
5.7.3 Remoção de inibidores 62
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 63
6.1 LAVAGEM AQUOSA **DA BIOMASSA DE CANA ENERGIA 63**
6.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA 63
6.3 EXPLOSÃO A VAPOR 66
6.3.1 Composição química das frações sólida e líquida após a explosão a vapor 68

6.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA 75
6.5 FERMENTAÇÃO 81
7 BALANÇO MÁSSICO 88
8 CONCLUSÃO 91
8.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 92
REFERÊNCIAS 94

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de uma economia de baixa emissão de carbono tem como um de seus principais alicerces a identificação de fontes renováveis para geração de energia limpa, como a bioenergia e a bioeletricidade. Tal premissa visa promover uma mudança radical da matriz energética contemporânea, que, em grande parte, está baseada em combustíveis derivados do petróleo, como gasolina, diesel, carvão mineral e gás natural (KHAN, SUDHAKAR e MAMAT, 2021). A utilização massiva destes combustíveis de origem fóssil precisa ser reduzida, uma vez que são responsáveis pelo acúmulo de gases poluentes na atmosfera, como CO_2, NOx e SOx (ZHANG *et al*., 2018; ZHONG *et al*., 2020).

De acordo com a *International Energy Agency* (IEA, 2024), a bioenergia é descrita como uma fonte energética renovável em que é produzida a partir da biomassa. O termo biomassa - introduzido inicialmente por Eugene Adam (1934) – refere-se aos materiais de origem biológica produzidos por seres vivos (animais, vegetais, fungos e protistas) em seus diferentes processos de biossíntese, desde a fixação de energia solar via fotossíntese até suas etapas da cadeia alimentar ou trófica (BRISTOTI e SILVA, 1993; JOHANSSON *et al*., 1993; WEREKO-BROBBY e HAGAN, 1996). A biomassa pode ser classificada em dois grupos: a primária e a secundária. A primária refere-se essencialmente aos resíduos naturais, encontrados diretamente na natureza, enquanto a secundária refere-se aos seus derivados, que são resíduos resultantes de processos de transformação tecnológicos da biomassa primária para obtenção de outro produto com valor agregado, como os biocombustíveis (HON e SHIRAISHI, 2001).

O emprego de biomassas, como os resíduos lignocelulósicos, para a produção de biocombustíveis é extremamente importante. Estes materiais se destacam como sendo a biomassa mais abundante do planeta e tem o potencial de atuar como fonte de carbono e de energia renovável para substituir o uso dos combustíveis fósseis, além da mitigação de impactos ambientais por se optar ao uso de resíduos como matéria-prima (PASQUAL *et al*., 2018). Nesse sentido, os biocombustíveis são essenciais no processo de descarbonização do setor de transporte, oferecendo uma alternativa de menor impacto ambiental para uso em

veículos leves a curto prazo e em caminhões pesados, navios e aeronaves a longo prazo, onde soluções sustentáveis ainda são escassas e onerosas. Entre as suas principais vantagens, o uso da biomassa lignocelulósica como insumo apresenta uma capacidade de minimizar as emissões de carbono e, simultaneamente, capturar o carbono já liberado, graças ao processo de fixação de CO_2 durante a fotossíntese (ZHANG *et al*., 2018; ZHONG *et al*., 2020; GRASSI e PEREIRA, 2019).

As políticas e as tendências econômicas atuais estão pautadas na geração de energia a partir de fontes renováveis. De acordo com a *International Energy Agency* (IEA, 2024), a demanda de biocombustíveis deverá aumentar 38 x 10^9 L entre 2023 e 2028, um aumento de quase 30% em relação ao último período de cinco anos. De fato, estima-se um aumento na procura total de biocombustíveis em 23%, 200 x 10^9 L até 2028. Os principais biocombustíveis líquidos são o biodiesel e o bioetanol, representando dois terços deste crescimento (133,33 x 10^9 L), seguidos do bioquerosene de aviação (66,67 x 10^9 L).

Em 2015, na 21ª Conferência das Nações Unidas sobre Mudança Climática (COP 21) em Paris, os países membros firmaram um acordo para diminuir a taxa de aquecimento global. Nesse evento, o Brasil voluntariamente se comprometeu a reduzir suas emissões de gases de efeito estufa em 43% e a garantir que 45% de sua matriz energética seja composta por energias renováveis, com metas estipuladas para serem atingidas até 2028 (FAPESP, 2023). Em novembro de 2024, o país apresentou uma nova meta climática, visando uma redução entre 59% e 67% até 2035, demonstrando um aumento na ambição em relação aos compromissos anteriores. Atualmente, as fontes renováveis representam 49,1% da matriz energética brasileira, superando a meta de 45% estabelecida para 2028 (BRASIL, 2023). Nesse contexto, a presente pesquisa visa demonstrar o potencial da cana energia Vertix 11, uma variação da cana-de-açúcar convencional, derivada de espécies silvestres com híbridos comerciais, para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica (produção de etanol celulósico ou E2G). Para tanto, serão empregadas técnicas de pré-tratamento por explosão a vapor, hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de pentoses e hexoses derivadas dos polissacarídeos presentes na composição química da cana energia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o potencial de uma variedade de cana energia (Vertix 11) para a produção de etanol celulósico (E2G), seguindo as etapas de pré-tratamento por explosão a vapor, hidrólise enzimática e fermentação de pentoses (oriundas de hemiceluloses como as xilanas) e hexoses (oriundas de glucanas como a celulose).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pré-tratamento por explosão a vapor do material lignocelulósico, visando maximizar a recuperação de seus principais componentes macromoleculares;
- Caracterizar a variedade de cana energia Vertix 11 em relação a seus constituintes;
- Caracterizar as frações sólida e líquida obtidas a partir da explosão a vapor e determinar o balanço de massas obtido no processo;
- Determinar a suscetibilidade dos substratos pré-tratados ao processo de hidrólise enzimática, utilizando complexos enzimáticos comerciais;
- Fermentar os hidrolisados produzidos por hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados, empregando microrganismo capaz de fermentar pentoses e hexoses;
- Determinar o desempenho da biomassa lignocelulósica de cana energia para a produção de E2G, quando aproveitado todo o material obtido na etapa de pré-tratamento e hidrólise, ou seja, o licor resultante da etapa de pré- tratamento por explosão a vapor (fração C5) e as fibras (fração C6).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção encontra-se uma revisão da literatura sobre o embasamento teórico envolvendo a produção de etanol celulósico ou de segunda geração (E2G), assim como um resumo de alguns estudos realizados com condições e/ou objetivos semelhantes aos propostos nesse trabalho.

3.1 CANA-DE-AÇÚCAR E CANA ENERGIA

A cana-de-açúcar é uma gramínea, da classe das monocotiledôneas, sendo um híbrido do gênero *Saccharum*. Dentre elas, destacam-se comercialmente as espécies *Saccharum sinense* e *S. officinarum* por apresentarem maiores teores de sacarose no colmo (SANTOS *et al*., 2006). O maior produtor de cana-de-açúcar no mundo é o Brasil, com uma área plantada prevista para safra 2024/25 em 8.673,1 $\times$ 10^3 ha e produtividade estimada em 79 $kg \cdot ha^{-1}$ (CONAB, 2024). Aproximadamente cerca de 1,7 $\times$ 10^9 T de cana-de-açúcar são produzidas anualmente em todo mundo, onde 713,2 $\times$ 10^6 T correspondem ao Brasil, em uma área cultivada de 24 $\times$ 10^9 ha (CTC, 2023).

Devido a sua alta produtividade, a cana-de-açúcar é a principal matéria-prima utilizada no país para a produção de açúcar (sacarose), etanol e bioenergia. A cana-de-açúcar é uma fonte significativa de energia renovável no Brasil, representando 18% da matriz energética nacional, ou 39% de toda a energia renovável ofertada. Isso destaca o papel do Brasil na liderança global do uso de energias limpas e renováveis (CTC, 2023).

Nas indústrias tradicionais de cana-de-açúcar, que se concentram na produção de açúcar e etanol, os níveis de fibra da cana devem ser mantidos entre 15% e 20%, fornecendo material suficiente para suprir a demanda energética da unidade sem comprometer a eficiência industrial na obtenção desses produtos. Por isso, pesquisadores adotaram estratégias de seleção para obter cultivares com alto teor de açúcar, dando ênfase ao teor da fibra em conjunto com uma maior produtividade de biomassa. Assim, com o avanço de novas tecnologias e em virtude do crescente interesse por fontes de energia renováveis, a fibra da cana-de-açúcar está se tornando um componente importante dessa matéria-prima, motivando

programas de melhoramento genético a desenvolver a cana energia (DE SOUZA BARBOSA *et al*., 2020).

A cana energia é um híbrido da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) que apresenta maior eficiência fotossintética e menor custo de produção, tornando-se com isso uma matéria-prima importante para acelerar a descarbonização do setor energético (CARVALHO-NETTO *et al*., 2014). Conforme indicado por Violante (2012), o desenvolvimento da cana energia surgiu essencialmente para aumentar a disponibilidade de biomassa para fins energéticos. Acreditava-se que essa transformação nos cultivares de cana seria viável através da realização de retrocruzamentos entre os híbridos atuais e espécies selvagens de *S. spontaneum*, incorporando assim características como alta produtividade e alto teor de fibras em uma mesma variedade. Isso, por sua vez, resultaria em aumentos na produção de biomassa por área plantada, maior resistência a pragas e boa adaptação a áreas agrícolas.

A cana energia, assim como a cana-de-açúcar, e a espécies de gramíneas, como a grama e o bambu, pertencem ao grupo de plantas rizomáticas. A cana-de-açúcar selvagem, ao longo dos últimos 100 anos, sofreu um processo de seleção de variedades orientado para um aumento do teor de sacarose no colmo. A presença de uma maior quantidade de rizomas na cana energia, combinada com um sistema radicular mais vigoroso, possibilita a absorção de uma quantidade significativamente maior de nutrientes do solo em um ritmo acelerado. O resultado é o rápido brotamento das plantas, um crescimento mais denso de perfilhos, maior longevidade e uma produtividade ampliada (SILVA *et al*., 2020).

Em comparação à cana-de-açúcar convencional, a cana energia é mais tolerante a condições climáticas adversas, requer menos fertilizantes, consome menos água e demanda replantio apenas a cada dez anos, em comparação com o ciclo de até cinco anos da cana-de-açúcar convencional (SIERRA *et al*., 2008). A **Tabela 1** compara algumas características da cana energia com as da cana-de-açúcar tradicional.

Tabela 1 - Comparação entre os parâmetros agronômicos da cana-de-açúcar e a cana energia.

Características	Cana-de-açúcar[1]	Cana energia[2]
Fibra (%)	17,4	26,4
Açúcares (%)	12,6	9,6

Produtividade (massa verde em t·ha^{-1})	92	140,5
Produtividade (fibra em t·ha^{-1})	16,0	36,7
Produtividade (açúcares em t·ha^{-1})	11,6	13,2
Ganho genético ao ano (%)	2	5
Exigência em fertilidade	alta	média
Resistência a pragas e doenças	baixa	média
Colheitas (por ciclo)	5	10

[1]Cana-de-açúcar convencional (RB92579) cultivado no Estado de São Paulo.
[2]Variedade de cana energia Vertix 11 cultivada no Estado de São Paulo.

Fonte: Adaptado de Ramos et al., (2025).

Na tabela acima, é possível observar que mesmo com um teor de açúcares menor, a quantidade total de matéria produzida por hectare na cana energia compensa essa diferença. Como o cultivar de cana energia Vertix 1 produz quase o dobro de biomassa por hectare comparado a cana-de-açúcar convencional, mesmo com menor teor de açúcares por tonelada, a quantidade total de açúcar extraída por área ainda acaba sendo maior para a variedade Vertix 1 de cana energia, resultando em uma maior produtividade de sacarose.

Segundo Tew e Cobiil (2008), a cana-de-açúcar pode ser classificada em três tipos distintos: (a) tipo I, que são variedades de cana com cerca de 75% de água, 12% de fibra e 13% de açúcar. Esta matéria-prima fornece caldo para a produção de açúcar e etanol, e fibra para a geração de eletricidade por combustão. Os programas de melhoramento desta cultivar focam na seleção de genótipos com alto teor de açúcar; (b) tipo II, que são variedades já consideradas como sendo um tipo de cana energia, selecionadas para maximizar a produção de açúcar e fibra. Conceituada por Alexander em 1985, esta variação de cana tem menor teor de água (65%), fibra variando de 13% a 17% (um aumento de até 40% em relação à cana tradicional) e pequena redução ou manutenção do teor de açúcar. Assim, essa matéria-prima, além de fornecer caldo para a produção de açúcar e etanol, contribui com mais fibra para a maior produção de eletricidade (por combustão), etanol lignocelulósico e outros derivados de valor econômico para a indústria da cana-de-açúcar; (c) tipo III, também já considerada um tipo de cana energia, essa variedade é selecionada para maximizar a produção de fibra (teor de fibra acima de 30%), com teor de açúcar ainda menor se comparado com os tipos I e II, e menor teor de água (60%).

Esta matéria-prima não é de interesse para a indústria atual de cana-de-açúcar (sucroalcooleira), sendo necessária para outros setores agroindustriais que precisam de biomassa para geração de energia.

As estratégias de seleção para o desenvolvimento de diferentes tipos de cana energia devem ser claramente estabelecidas no início de processo produtivo. A maioria das instituições define suas estratégias com base na proporção relativa de açúcar e fibra desejada. Assim, é essencial ter uma diversidade genética significativa, especialmente em relação aos teores de açúcar e fibra nas espécies do complexo *Saccharum*.

3.2 ETANOL CELULÓSICO OU ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (E2G)

O etanol, quando produzido a partir de matérias-primas à base de açúcares simples e amido, é conhecido como etanol de primeira geração (1G) e amplamente utilizado em mistura com a gasolina. Os Estados Unidos e o Brasil são os maiores produtores mundiais de etanol combustível. Em 2016, os Estados Unidos tinham uma produção de aproximadamente $57,7 \times 10^6$ L, majoritariamente a partir do milho. Em contrapartida, o Brasil possuía uma produção de cerca de $27,6 \times 10^6$ L, principalmente derivada de caldo ou melaço de cana-de-açúcar (MOHANTY; SWAIN, 2019). No Brasil, a produção de etanol em 2018 era de aproximadamente 33×10^6 L; em 2023, essa capacidade aumentou para cerca de 35×10^6 L, um aumento de 6,1% (TRADE COMMISSION, 2023).

O etanol de primeira geração (1G) enfrenta desafios de sustentabilidade. Esse desafio é acentuado pelo aumento populacional e pela demanda consequente por alimentos, principalmente em países em desenvolvimento como China e Índia, que possuem grandes populações. Na última década, os debates sobre o impacto do etanol de 1G sobre a segurança alimentar e a biodiversidade, associados ao desmatamento para a produção de cana-de-açúcar e milho para a indústria de biocombustíveis, não foram resolvidos (RAMOS *et al*., 2016). Já a biomassa lignocelulósica, particularmente quando se trata de resíduos agrícolas, agroflorestais e agroindustriais, não está relacionada à questão alimentar e encontra-se disponível em abundância, sem limitações geográficas (LIU *et al*., 2019).

A utilização de biomassa lignocelulósica em grande escala não compete

direta ou indiretamente com a produção de alimentos. Isso a torna uma matéria-prima sustentável para a produção de etanol de segunda geração (2G) (GUPTA; VERMA, 2015). Os principais componentes da biomassa lignocelulósica são celulose, hemicelulose e lignina, que estão entrelaçados formando complexos de lignina-carboidrato (LCCs), além de pequenas quantidades de extrativos e sais minerais. Os LCCs são resistentes à degradação, portanto, é necessário um pré-tratamento para separar esses componentes macromoleculares, permitindo que a hidrólise enzimática libere carboidratos para a fermentação a etanol (CHUNDAWAT *et al*., 2011).

Na produção de etanol 2G, uma etapa de hidrólise é crucial para converter os polissacarídeos presentes na parece celular vegetal em açúcares simples, passíveis de fermentação. Diferentes técnicas de pré-tratamentos têm sido propostas para desconstruir o LCCs e assim facilitar a hidrólise enzimática da celulose. Estas técnicas também são fundamentais para o fracionamento da biomassa lignocelulósica em seus principais componentes e a utilização destes segundo o conceito de biorrefinarias (ROCHA *et al*., 2011).

A produção de etanol 2G a partir da cana-de-açúcar engloba cinco etapas principais: coleta e condicionamento da biomassa, pré-tratamento, hidrólise dos substratos pré-tratados, fermentação dos hidrolisados e separação do produto por destilação (ARAÚJO *et al*., 2013). A primeira fase envolve a coleta, lavagem e transporte da biomassa por meio de esteiras. Posteriormente, a biomassa é submetida à etapa de pré-tratamento. Na sequência, o material pré-tratado é acondicionado em um tanque coletor, no qual são gerados um substrato fibroso e um licor de pré-tratamento, também denominado hidrolisado hemicelulósico ou fração C5.

O próximo estágio, para este trabalho, consiste na hidrólise enzimática. Nesta etapa, o objetivo é converter os polissacarídeos em açúcares solúveis para o processo fermentativo. Esse processo é controlado rigorosamente por meio de parâmetros como o teor de sólidos, a dosagem de enzima, a temperatura, o tempo de residência e o pH do meio. Com os açúcares convertidos em sua forma monomérica, segue-se para a etapa de fermentação.

A fermentação visa produzir etanol a partir dos açúcares livres presentes no meio reacional. Caracteriza-se por ser uma etapa estritamente biológica, pois envolve o metabolismo de microrganismos etanologênicos específicos. Ao ser alcançando o teor alcoólico desejado, o mosto fermentado é submetido à

destilação, resultando no etanol celulósico como produto (AGUIAR, 2017).

3.3 CENÁRIO ATUAL DE E2G

A fim de fomentar o uso de combustíveis sustentáveis e com menor impacto ambiental, a Presidência da República instituiu, por meio da Resolução 07, de 20 de abril de 2021, o Programa Combustível do Futuro (PCF). Essa iniciativa visa propor estratégias para ampliar a utilização de combustíveis de baixa pegada de carbono, além de promover avanços na tecnologia veicular nacional, com o propósito de reduzir as emissões do setor de transporte (BRASIL, 2021).

O etanol celulósico, também conhecido como etanol de segunda geração (E2G), é um biocombustível líquido caracterizado por sua baixa emissão de carbono, chegando a apresentar cerca de 90% menos emissões em comparação à gasolina. Apesar de possuir as mesmas propriedades físico-químicas do etanol convencional, esse biocombustível pode ser utilizado diretamente em veículos ou incorporado à gasolina.

No Brasil, três unidades industriais já operam comercializando esse produto, sendo uma delas atendendo majoritariamente ao mercado externo. A primeira é a unidade Costa Pinto, da Raízen, localizada em Piracicaba, São Paulo, com capacidade de produção de aproximadamente 35 milhões de litros por ano. A segunda é a planta Bioflex I, da GranBio, situada em São Miguel dos Campos, Alagoas, que utiliza tecnologia própria e tem como matéria-prima a palha de cana-de-açúcar. Além disso, a Raízen inaugurou recentemente a terceira planta de etanol celulósico em operação no Brasil, no Parque de Bioenergia Bonfim, em Guariba, São Paulo, consolidando-se como a maior unidade do mundo com uma capacidade de produção de 82 milhões de litros anuais, evidenciando a evolução do E2G para a sua viabilização industrial e tecnológica (GRANBIO, 2025; RAÍZEN, 2025).

Embora o E2G já tenha progredido cada vez mais para sua viabilidade tecnológica, sua produção ainda enfrenta desafios relacionados à redução dos custos. Esses obstáculos podem ser superados com o aumento da escala produtiva, permitindo maior eficiência e competitividade. Nesse contexto, incentivos econômicos são essenciais para estimular investimentos e viabilizar o crescimento da produção, proporcionando os ganhos de escala necessários para tornar esse biocombustível mais acessível no mercado (CGEE, 2025; ANP, 2025).

3.3.1 Descarbonização e seu auxílio na ambição climática do Brasil

O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) tem enfatizado a urgência na redução significativa das emissões de gases de efeito estufa (GEE) para conter o aquecimento global e seus impactos, como o aumento na frequência e intensidade de eventos climáticos extremos, incluindo ondas de calor, chuvas intensas e períodos prolongados de seca agrícola. Nesse contexto, a ampliação da produção e do uso de biocombustíveis, especialmente aqueles classificados como avançados, como o etanol de segunda geração (E2G), representa um dos compromissos fundamentais do Brasil perante a Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas (UNFCCC) (BRASIL, 2021). Esse compromisso foi formalizado na Contribuição Nacionalmente Determinada (NDC) do país no âmbito do Acordo de Paris, principal tratado internacional brasileiro voltado à mitigação das mudanças climáticas. Com base nos níveis de emissões de 2005, o Brasil estabeleceu como meta a redução de 43% das emissões até 2030, mantendo o compromisso assumido em 2015, e declarou a intenção de alcançar a neutralidade climática até 2050 (NDC, 2021; LORENZI E ANDRADE, 2019).

Em resposta a esse compromisso, o Brasil implementou a Política Nacional de Biocombustíveis, conhecida como RenovaBio, por meio da Lei nº 13.576/2017, com o objetivo de impulsionar a expansão sustentável da produção e do consumo de biocombustíveis na matriz energética nacional. O principal mecanismo dessa política consiste na definição de metas anuais de descarbonização para o setor de combustíveis destinados ao transporte, estimulando o aumento da participação dos biocombustíveis na matriz energética. O RenovaBio reconhece o valor dos biocombustíveis com base em sua capacidade de redução das emissões de GEE em comparação aos combustíveis fósseis convencionais. Assim, quanto menor for a pegada de carbono dos biocombustíveis ao longo de seu ciclo de vida e maior o volume produzido, maior será a geração de créditos de descarbonização (CBIOs) pelas unidades produtoras, sendo que cada CBIO corresponde à mitigação de uma tonelada de dióxido de carbono equivalente (CO_2eq) (EMBRAPA, 2025; EIA, 2024).

Dentro dessa lógica, o RenovaBio fomenta duplamente a produção do etanol de segunda geração. Primeiramente, por permitir o aproveitamento mais eficiente da biomassa disponível, resultando em maior produção de biocombustível sem

necessidade de expandir a área plantada. Em segundo lugar, por valorizar biocombustíveis com menor intensidade de carbono, possibilitando que as unidades produtoras de E2G acumulem mais CBIOs em comparação às de etanol de primeira geração (E1G) (ANP, 2025).

No entanto, ao analisar políticas internacionais que estipulam metas específicas para biocombustíveis avançados, como o Renewable Fuel Standard (RFS) nos Estados Unidos e a Renewable Energy Directive (RED II) na União Europeia, percebe-se que os incentivos oferecidos pelo RenovaBio ao E2G ainda são limitados (EUROPEAN COMISSION, 2018). Diferentemente desses programas internacionais, o RenovaBio não diferencia o E2G dos biocombustíveis convencionais, como o etanol de primeira geração e o biodiesel. Apesar disso, há potencial para a regulamentação de dispositivos previstos na Lei nº 13.576/2017 que ainda não foram implementados, como a adoção de incentivos para contratos de longo prazo e estímulos à captura de carbono com balanço líquido negativo no processo produtivo (ANP, 2025).

Diversos estudos presentes na literatura (IEA, 2024; OECD/IEA, 2017; WANG *et al*., 2012) indicam que a produção de etanol de segunda geração (E2G) proporciona benefícios ambientais significativos, especialmente no que se refere à redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE) e à menor dependência de combustíveis fósseis. Esse desempenho ambiental superior do E2G também tem sido observado nas unidades produtivas brasileiras.

Com base em informações obtidas pelo Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR/CNPEM) e nas próprias empresas produtoras de E2G no Brasil, verificou-se que as emissões associadas à produção desse biocombustível são aproximadamente 50% inferiores em comparação ao etanol de primeira geração (E1G) (LNBR, 2025). Como consequência, a geração de créditos de descarbonização (CBIOs) pelas unidades produtoras de E2G apresenta um aumento estimado em torno de 15%.

Por ser obtido a partir da fração lignocelulósica da biomassa, o etanol de segunda geração possui uma vantagem competitiva significativa, pois utiliza resíduos agroindustriais, como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, como matéria-prima principal. Esse modelo de produção baseado em resíduos lignocelulósicos contribui para reduzir os debates internacionais sobre a concorrência entre biocombustíveis e alimentos, além de minimizar preocupações

relacionadas às emissões indiretas resultantes da mudança no uso da terra.

Embora essas discussões tenham menor relevância no Brasil, devido à experiência consolidada na produção integrada de E1G e açúcar, bem como à disponibilidade de vastas áreas agrícolas para expansão sem necessidade de desmatamento de vegetação nativa (HERNANDES *et al*., 2021), a produção de E2G pode tornar o país ainda mais competitivo no mercado internacional. Isso ocorre porque há um interesse crescente, impulsionado por diretrizes globais, na ampliação do uso de biocombustíveis avançados.

Portanto, os benefícios ambientais associados à produção de E2G devem ser mensurados por meio de uma avaliação detalhada da sustentabilidade. Essa análise deve acompanhar a ampliação da produção em larga escala, visto que o setor ainda se encontra em estágio inicial e apresenta amplo potencial de desenvolvimento. Além disso, deve considerar avanços tecnológicos contínuos, como a melhoria das enzimas e o uso de micro-organismos geneticamente modificados, incentivando o fortalecimento da pesquisa nacional. A diversificação de produtos no contexto de biorrefinarias, baseada na valorização das diferentes frações da biomassa, é essencial para garantir que os avanços tecnológicos promovam uma maior sustentabilidade do E2G (MELO, 2020; PROJETO SUCRE, 2020).

3.3.2 Biorrefinarias e valorização

A necessidade de substituir o atual modelo industrial, fortemente dependente de recursos fósseis, por alternativas baseadas em fontes renováveis é amplamente reconhecida. Essa mudança se justifica por diversos fatores, como a urgência em mitigar os impactos das mudanças climáticas e cumprir metas globais, como a neutralidade de emissões de gás carbônico até 2050 (IEA, 2022), além das incertezas relacionadas à disponibilidade e aos preços do petróleo, frequentemente afetados por questões geopolíticas.

Nesse contexto, o desenvolvimento e a implementação de biorrefinarias surgem como uma solução promissora, agregando valor às cadeias do agronegócio e contribuindo para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas na Agenda 2030. De maneira geral, uma biorrefinaria é uma instalação industrial que converte biomassa em

diversos produtos de valor agregado, como biocombustíveis, bioenergia e biomoléculas, incluindo biopolímeros, biosurfactantes, biopigmentos e proteínas para alimentação humana e animal. O propósito fundamental dessas unidades industriais é transformar os diferentes componentes da biomassa, como açúcares, amidos, lipídios, celulose, hemicelulose e lignina, em produtos de interesse, utilizando combinações de processos tecnológicos que envolvem conversão, separação e purificação (MELO, 2020; LORENZI E ANDRADE, 2019).

A diversificação do portfólio de produtos permite otimizar sinergias nos processos industriais, seja por meio do aproveitamento de energia, materiais ou infraestrutura, resultando na redução dos custos de produção e dos impactos ambientais. Além disso, essa abordagem diminui a vulnerabilidade das biorrefinarias às oscilações de preços no mercado. No Brasil, um exemplo consolidado dessa estratégia são as biorrefinarias de cana-de-açúcar, que além de etanol e açúcar, produzem eletricidade e coprodutos como proteína para ração animal, biogás/biometano e biofertilizantes.

A produção de E2G se destaca dentro desse conceito, pois, além de aproveitar as vantagens das biorrefinarias, aplica os princípios da economia circular ao utilizar resíduos agroindustriais como matéria-prima. A sua fabricação incorpora novas tecnologias que viabilizam o fracionamento da biomassa lignocelulósica para obtenção de açúcares avançados e lignina. Enquanto os açúcares são majoritariamente empregados na produção de E2G e, em menor escala, na síntese de biomoléculas de alto valor agregado, a lignina, obtida como coproduto, pode ser utilizada como combustível para geração de energia ou transformada em produtos químicos de maior valor.

A configuração dos produtos associados à produção de E2G varia conforme as demandas do mercado, a maturidade das tecnologias disponíveis e os preços de comercialização. Nesse sentido, a escalabilidade dos biocombustíveis permitirá a adoção de diferentes configurações tecnológicas nas biorrefinarias, posicionando o E2G como um elemento central para a expansão e diversificação da bioeconomia brasileira (CGEE, 2025).

A disponibilidade de biomassa a custos competitivos também possibilita a substituição de matérias-primas fósseis em outros setores, como a indústria petroquímica, promovendo a produção integrada de químicos verdes e E2G. A gama de produtos químicos derivados da biomassa inclui compostos amplamente

aplicáveis, conhecidos como building blocks, como ácido succínico, butadieno, farneseno e óleos especiais (BAIN & COMPANY GAS ENERGY, 2014).

Esse conjunto de atividades econômicas, fundamentado no uso de tecnologias modernas de conversão de biomassa, é frequentemente denominado biotecnologia industrial e apresenta um grande potencial de atração de investimentos. De acordo com estimativas da Associação Brasileira de Bioinovação (ABBI), esse setor poderá movimentar mais de US$ 130 bilhões nas próximas duas décadas (ABBI, 2024).

3.3.3 Principais projetos em curso no Brasil e no mundo

Até o final de do ano de 2024, além das unidades produtivas combinadas com o etanol de primeira geração (E1G) ou com fibras de milho, haviam sido construídas outras plantas comerciais específicas para a produção de etanol celulósico ao redor do mundo. Conforme mostrado na **Tabela 2**, dessas dez unidades, duas foram descomissionadas, vendidas e posteriormente convertidas para outras finalidades. A planta anteriormente pertencente à Abengoa foi adquirida pela Synata e atualmente é utilizada para a produção de produtos químicos e combustíveis líquidos a partir de gás natural. Da mesma forma, a unidade da Dupont foi vendida para a Verbio e passou a ser empregada na produção de Gás Natural Renovável (BNDES, 2024).

Tabela 2 – Atividade e produção de plantas comerciais de E2G no mundo.

País	Produtor	Localização	Capacidade (10^6 L)	Status
EUA	Quad Country	Galva	15,15	Em operação
Brasil	Raízen	Piracicaba	35,00	Em operação
Canadá	Enerkem	Edmonton	37,85	Em operação
Brasil	GranBio	São Miguel dos Campos	50,00	Em operação

Itália	Versalis	Crescentino	56,80	Em operação
Romênia	Clariant	Podari	60,50	Em operação
EUA	Poet-DSM	Emmetsbug	75,70	Hibernada
Brasil	Raízen	Guariba	82,00	Em operação
EUA	Abengoa	Hugoton	95,50	Descomissionada
EUA	Dupont	Nevada	115,55	Descomissionada

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

As instalações listadas acima possuem capacidade nominal superior a 1 milhão de litros por mês, o que as configura como plantas comerciais, sendo que algumas atingem volumes significativamente elevados, como a planta da Dupont em Nevada, com 115,55 milhões de litros anuais. No entanto, apesar da capacidade instalada, muitas dessas unidades não operam em plena carga devido a dificuldades econômicas e comerciais. No Brasil, a Raízen possui duas unidades operacionais, em Piracicaba e Guariba, com capacidades de 35 e 82 milhões de litros por ano, respectivamente, consolidando o país como um dos líderes na produção de E2G. A GranBio, com sua unidade em São Miguel dos Campos, também se destaca, com uma capacidade de 50 milhões de litros anuais.

Apesar do avanço na infraestrutura produtiva, o etanol de segunda geração (E2G) ainda enfrenta desafios relacionados ao seu custo elevado em comparação ao etanol de primeira geração (E1G). Esse fator impacta diretamente a viabilidade econômica das unidades, uma vez que os custos de produção mais altos exigem preços diferenciados para garantir a rentabilidade do setor. Além disso, a comercialização do E2G nem sempre ocorre com valores que justificam o investimento na tecnologia, dificultando sua competitividade frente a combustíveis fósseis e ao próprio E1G (PROJETO SUCRE, 2020).

Atualmente, das dez plantas listadas, sete permanecem operacionais, mas operam abaixo de sua capacidade total devido às dificuldades de mercado. A planta da unidade da Poet-DSM, nos Estados Unidos, foi hibernada, refletindo os desafios econômicos enfrentados pelo setor. Já as unidades da Abengoa e da Dupont foram descomissionadas e convertidas para outras finalidades, o que evidencia a necessidade de políticas mais robustas para viabilizar a produção contínua e

sustentável do E2G.

3.3.4 Estimativa de custos e perspectiva de evolução

Os custos da produção do E2G são influenciados por diversos fatores, incluindo a localização da planta industrial, que impacta a logística e a disponibilidade de matérias-primas. Estudos indicam que o Brasil apresenta vantagens competitivas devido ao menor custo da biomassa, enquanto outros custos se mantêm relativamente similares em diferentes regiões globais (BNDES, 2024).

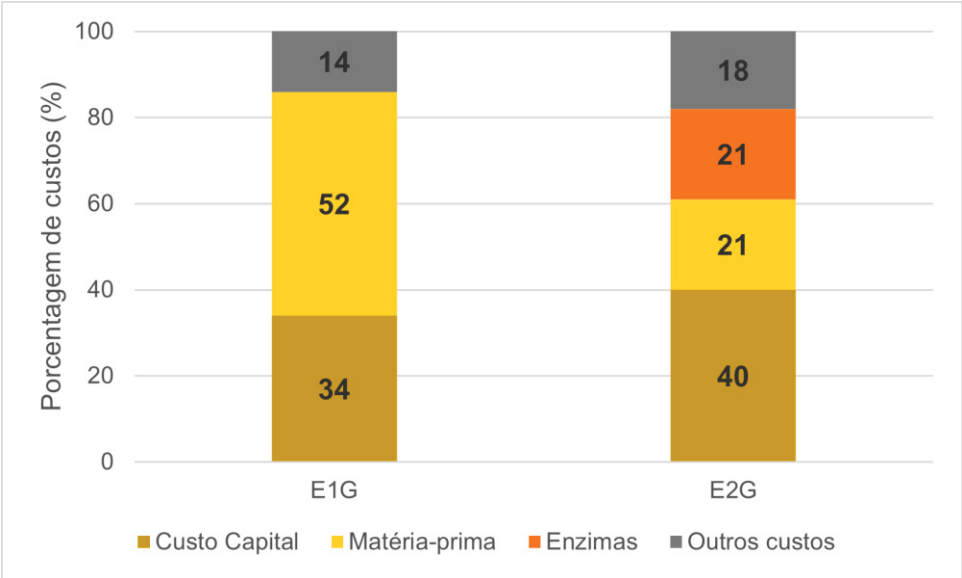
Fatores como a capacidade de processamento, a configuração tecnológica e a integração com outras unidades industriais também afetam a viabilidade econômica do E2G. A associação com plantas de E1G permite compartilhar infraestrutura, reduzir custos operacionais e otimizar mão de obra (JORNAL DA UNICAMP, 2019).

Comparando a produção de E1G e E2G em novas unidades industriais, estudos estimaram que o custo médio de produção do E2G é superior ao do E1G, com um diferencial de aproximadamente R$ 0,46 por litro. Vale ressaltar que o E2G tem potencial de queda de custo à medida que a tecnologia evolui, semelhante ao que ocorreu com o E1G durante o programa Proálcool (IEA, 2024).

Outro fator relevante na análise econômica do E2G é sua competitividade com a gasolina. Considerando sua equivalência energética, estima-se que o E2G seria economicamente viável com preços do petróleo acima de US$ 65 por barril. Essa análise, no entanto, requer atualizações constantes devido à variabilidade dos preços de combustíveis e insumos.

Os custos totais do E2G incluem tanto o investimento em capital (CAPEX), referente a equipamentos e infraestrutura, quanto os custos operacionais (OPEX), que abrangem matéria-prima, insumos e manutenção. No caso do E1G, a matéria-prima representa mais de 50% do custo total, enquanto para o E2G esse valor é menor devido ao uso de resíduos agroindustriais. No entanto, o custo das enzimas utilizadas na hidrólise do E2G representa cerca de 21% do total, tornando-se um fator de grande impacto na viabilidade econômica (BNDES, 2024). A **Figura 1** representa a composição dos custos totais de produção de E1G e E2G.

Figura 1 - Composição dos custos totais de produção de E1G e E2G.



Fonte: Adaptado de BNDES, 2024.

A complexidade do processo de E2G exige investimentos adicionais em infraestrutura e etapas de pré-tratamento da biomassa, aumentando o CAPEX em mais de 40% quando comparado ao E1G para uma mesma capacidade produtiva. Apesar disso, espera-se que futuras melhorias tecnológicas e ganhos de escala possam reduzir esses custos ao longo do tempo, tornando o E2G cada vez mais competitivo no mercado de biocombustíveis (ANP, 2024).

3.3.5 Redução de custos e pontos de melhoria

A redução dos custos de produção do etanol de segunda geração (E2G) dependerá da padronização das soluções de engenharia e do aumento da escala produtiva. Com a maior fabricação de equipamentos específicos e a intensificação da concorrência entre fornecedores, espera-se que os processos produtivos se tornem mais eficientes e economicamente viáveis (ANP, 2024).

Para que o E2G alcance maturidade tecnológica e econômica, será necessário percorrer um caminho semelhante ao E1G, que, desde o Proálcool, contou com incentivos governamentais para reduzir custos ao longo do tempo. No caso do E1G, essa curva de aprendizado levou a uma queda significativa de custos, permitindo ao Brasil consolidar-se como líder global na substituição de combustíveis fósseis para mobilidade (BNDES, 2024).

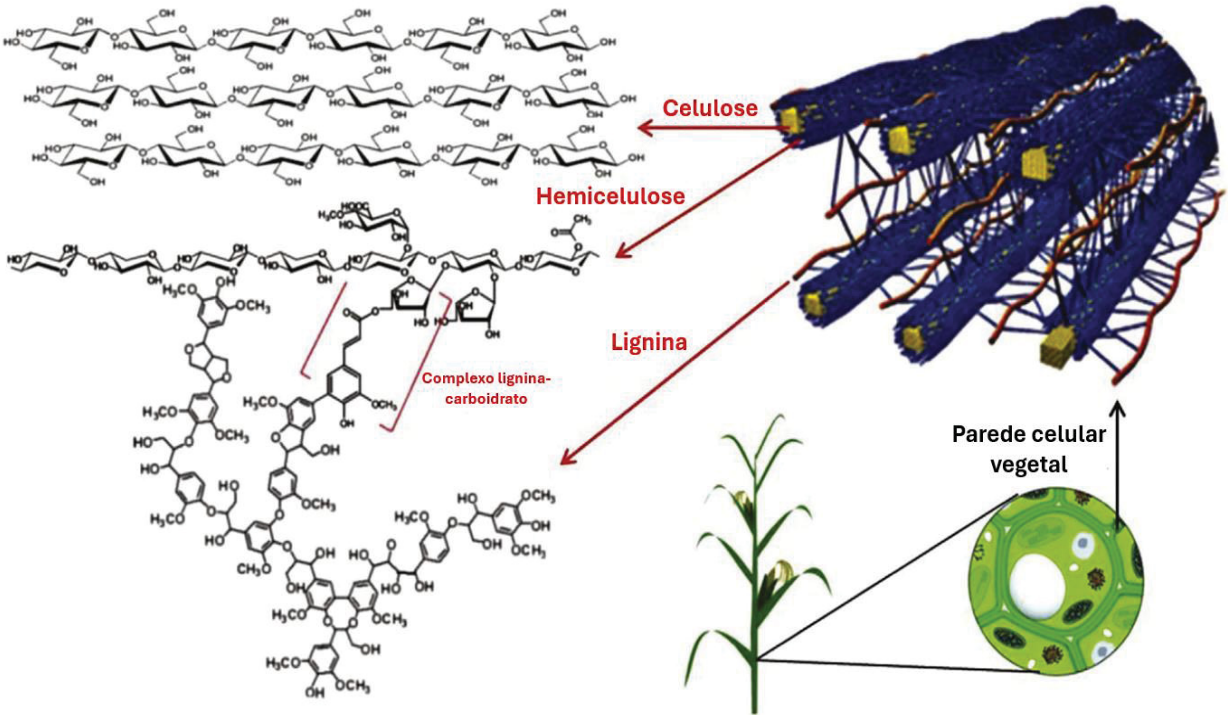
Referente as despesas de capital (CAPEX), um dos maiores desafios está no desenvolvimento de soluções de engenharia que combinem robustez e baixo custo. Isso inclui a melhoria no projeto e na operação de equipamentos essenciais, como bombas, válvulas, sensores e sistemas de controle. Já as despesas operacionais (OPEX), o maior obstáculo está na necessidade do uso de coquetéis enzimáticos para a hidrólise da biomassa. Esses coquetéis são mais complexos e caros do que as enzimas utilizadas na conversão de amido em etanol, como ocorre na produção do etanol de milho. Ainda assim, avanços tecnológicos podem reduzir os custos ao longo do tempo, como aconteceu com as enzimas para hidrólise do amido, cujo preço caiu aproximadamente 70% entre 1980 e 2005 (ANP, 2024; BNDES, 2024; JORNAL DA UNICAMP, 2019).

Por fim, para que o E2G se torne economicamente viável, é essencial continuar investindo na otimização dos processos produtivos, no desenvolvimento de novas tecnologias para redução de custos e na criação de incentivos para a expansão do setor. Superar esses desafios permitirá uma maior competitividade frente aos combustíveis fósseis e consolidará o E2G como uma alternativa sustentável e economicamente atrativa.

3.4 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é a fonte de carbono orgânico mais abundante do planeta, constituindo a parede celular vegetal. A biomassa é composta, principalmente, por carboidratos estruturais como celulose e hemiceluloses, bem como por um derivado fenilpropanóide denominado lignina, além de outros componentes em menor quantidade (LIU *et al*., 2019). O teor desses componentes varia conforme diferentes espécies e variedades de plantas, bem como entre diferentes tecidos vegetais de uma mesma planta. Além disso, sua presença pode sofrer influência de condições de cultivo, como clima, solo e práticas de fertilização. Resíduos agrícolas como palha e sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e palhas de trigo e de arroz, contêm aproximadamente 30–50% de celulose, 20–35% de hemicelulose e 10–20% de lignina (ZABED *et al*., 2016). Já os componentes minoritários podem ser classificados em substâncias inorgânicas e orgânicas (FENGEL e WEGNER, 1989). A estrutura da biomassa lignocelulósica é mostrada na **Figura 2**.

Figura 2 - Estrutura da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Yousef; Pirozzi; Sannino (2020).

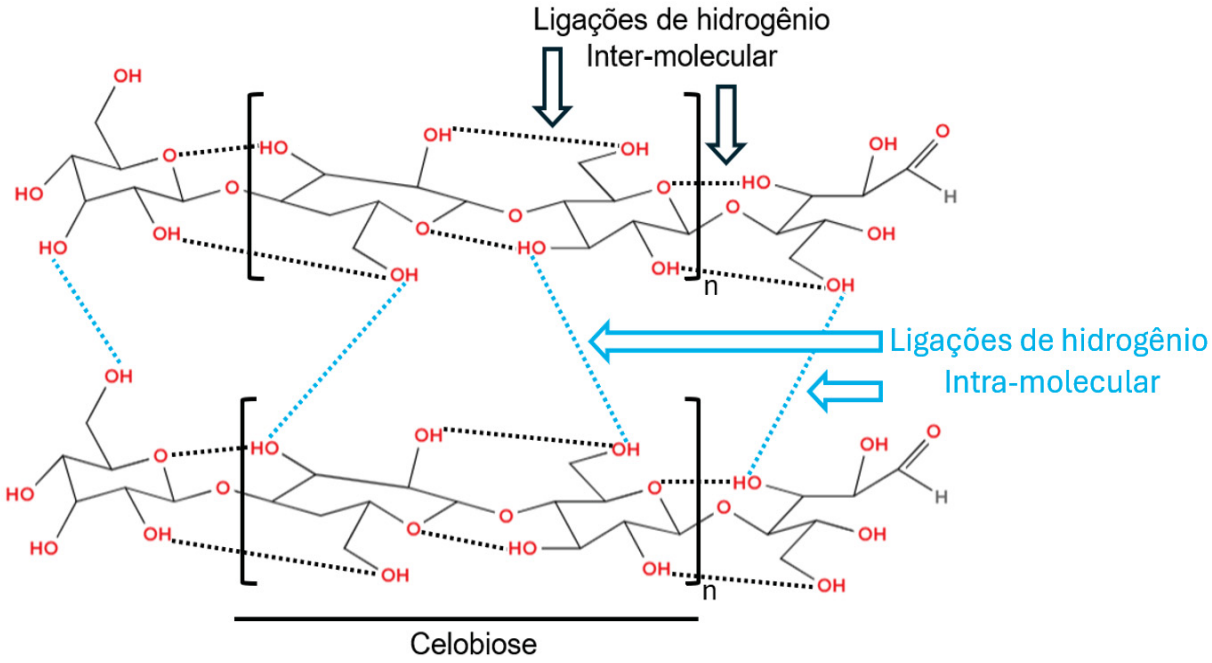
Os componentes orgânicos de baixa massa molecular das plantas são responsáveis por características como cor, sabor e cheiro, também conhecidos como extraíveis. Esses compostos podem incluir terpenos, estilbenos, flavonoides, ácidos fenólicos, gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, lignanas e hidrocarbonetos (FENGEL e WEGENER, 1989). Além dos extraíveis, que são removidos por solventes, existem os componentes não-extraíveis, como proteínas, materiais pécticos e cinzas. As cinzas, frações inorgânicas, desempenham funções específicas no metabolismo das plantas e, em biomassas como o bagaço de cana-de-açúcar, frequentemente contêm sílica absorvida do solo (CRUZ *et al*., 2019). Outros compostos encontrados nas cinzas do bagaço e palha da cana-de-açúcar incluem CaO, MgO, MnO, K_2O, Na_2O, SrO e Fe_2O_3 (SZCZERBOWSKI *et al*., 2014). Esta matriz lignocelulósica é naturalmente resistente a microrganismos e enzimas, tornando sua estrutura extremamente recalcitrante e dificultando o processamento e isolamento dos seus principais componentes (LIU *et al*., 2019).

3.5 CELULOSE

A celulose é o polímero biogênico mais abundante na natureza, presente em uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias, algas e plantas superiores. Em materiais lignocelulósicos, ela desempenha uma função estrutural significativa, compondo entre 30-50% das paredes celulares das plantas superiores (RAMOS *et al*., 2016). Quimicamente, a celulose é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de anidro-D-glucopiranose unidas por ligações β-glicosídicas nas posições 1 e 4 dos anéis piranosídicos. A ligação β-(1,4) entre duas unidades de glucose forma um dímero denominado celobiose (4-O-β-D-glucopiranosil-D-glucopiranose), que é a unidade repetitiva básica da celulose sob uma perspectiva conformacional (**Figura 3**) (RAMOS, 2003).

A celulose possui propriedades mecânicas intrínsecas atribuídas a sua forma cristalina, apresentando valores muitas vezes superiores aos da maioria dos metais, ligas, polímeros sintéticos e materiais cerâmicos. Essa resistência mecânica, principalmente a forças de tensão, deriva parcialmente dos grupos hidroxila densamente distribuídos (três grupos por unidade de anidroglucose) nas suas cadeias, que formam uma rede de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (**Figura 3**). Como resultado, a celulose cristalina não se dissolve em água nem na maioria dos solventes orgânicos. Termodinamicamente, há um ponto limite para o crescimento do agregado cristalino, a partir do qual a organização regular das cadeias se perde, fazendo com que elas adotem uma orientação aleatória, formando regiões de baixa ordenações denominadas de amorfas. É importante notar que a proporção entre as regiões cristalinas e amorfas pode variar conforme a origem e o processamento do material (FENGEL e WEGNER, 1989; MAIA, 2023).

Figura 3 - Estrutura da celulose, evidenciando a celobiose como sua unidade conformacional básica, bem como a formação de ligações de hidrogênio intra (em azul) e intermoleculares (em vermelho).



Fonte: Adaptado de Baghaei; Skrifvars (2020).

3.6 HEMICELULOSES

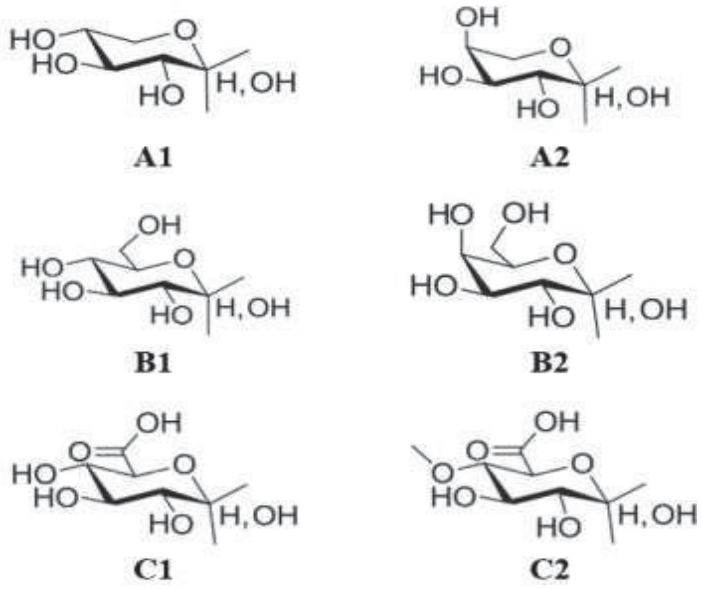
Além da celulose, diversos polissacarídeos conhecidos como polioses ou hemiceluloses, estão presentes como o segundo componente mais abundante na biomassa lignocelulósica. O termo hemiceluloses foi cunhado por E. Schulze em 1891. As hemiceluloses se distinguem da celulose por serem formadas por uma variedade de monossacarídeos e apresentarem cadeias moleculares mais curtas e ramificadas. Ou seja, as hemiceluloses fazem parte de uma família de heteropolissacarídeos que ocorrem juntamente com a celulose na parede celular, e a sua natureza química varia entre diferentes espécies e tecidos vegetais (FENGEL e WEGENER, 1989).

Os principais constituintes das hemiceluloses correspondem às hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose), pentoses (D-xilose, L-arabinose) e ácidos urônicos (ácido β-D-glucurônico, ácido 4-O-metil-D-glucurônico) (FENGEL e WENEGER, 1989). A **Figura 4** mostra os principais monossacarídeos presentes nas hemiceluloses, que usualmente apresentam cadeias ramificadas devido à presença de distintas unidades monoméricas com grupos de hidroxilas que podem

ser substituídos, possibilitando a criação de diversos arranjos macromoleculares.

Devido à diversidade estrutural e ao arranjo espacial das cadeias, as possibilidades de formação de ligações de hidrogênio nas hemiceluloses são mais limitadas, resultando em um material com menor organização molecular e mais vulnerável à degradação térmica, biológica ou química em comparação com a celulose (QASEEM *et al*., 2021; RAMOS, 2003). A cadeia principal das hemiceluloses pode ser composta por unidades de xilose (xilanas), manose (mananas) e pela combinação destas com glucose (xiloglucanas e glucomananas).

Figura 4 – Representação das fórmulas estruturais das unidades monoméricas mais encontradas nas hemiceluloses: (A1) D-xilose, (A2) L-arabinose, (B1) D-glucose, (B2) D-galactose, (C1) ácido-D-glucurônico e (C2) ácido 4-O-metil-D-glucurônico.

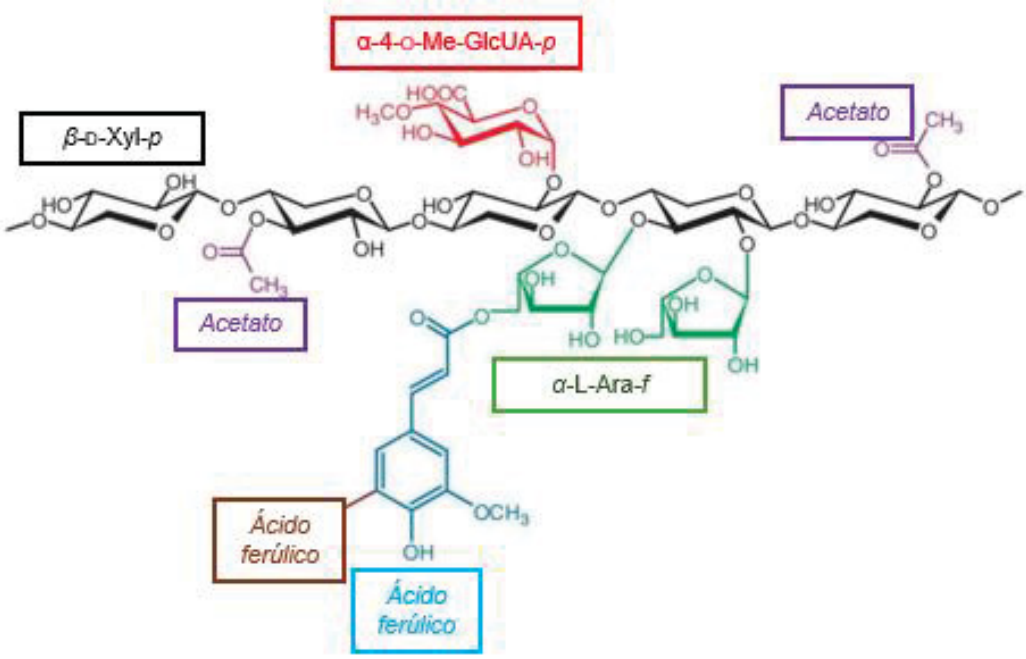


Fonte: Qaseem *et al.,* (2022).

As hemiceluloses atuam na estabilização da parede celular por meio de ligações de hidrogênio com a celulose e ligações covalentes com a lignina (WYMAN *et al*., 2005). A xilana é o polissacarídeo predominante nas hemiceluloses de gramíneas, sendo, portanto, a hemicelulose mais comum em resíduos agrícolas e agroindustriais, como a cana-de-açúcar (GÍRIO *et al*., 2010). A xilana é um polissacarídeo cuja estrutura consiste em uma cadeia de resíduos de D-xilose ligados por meio de ligações β-1,4. Além disso, a cadeia da xilana pode apresentar ramificações que contêm L-arabinose, ácidos D-glucurônico ou 4-O-metil-D- glucurônico e ácidos cinâmicos como o ácido ferúlico (**Figura 5**). Xilanas

isoladas de diferentes plantas possuem a mesma estrutura linear, diferenciando-se pelos substituintes da cadeia principal ou grupos pendentes (FENGEL e WEGNER, 1989; MADEIRA JUNIOR, 2017; ÁLVAREZ *et al*., 2017).

Figura 5 - Estrutura geral ilustrando as ramificações que podem ser encontradas em diversas xilanas isoladas da parede celular de plantas.



Fonte: Adaptado de Cann; Dodd (2009).

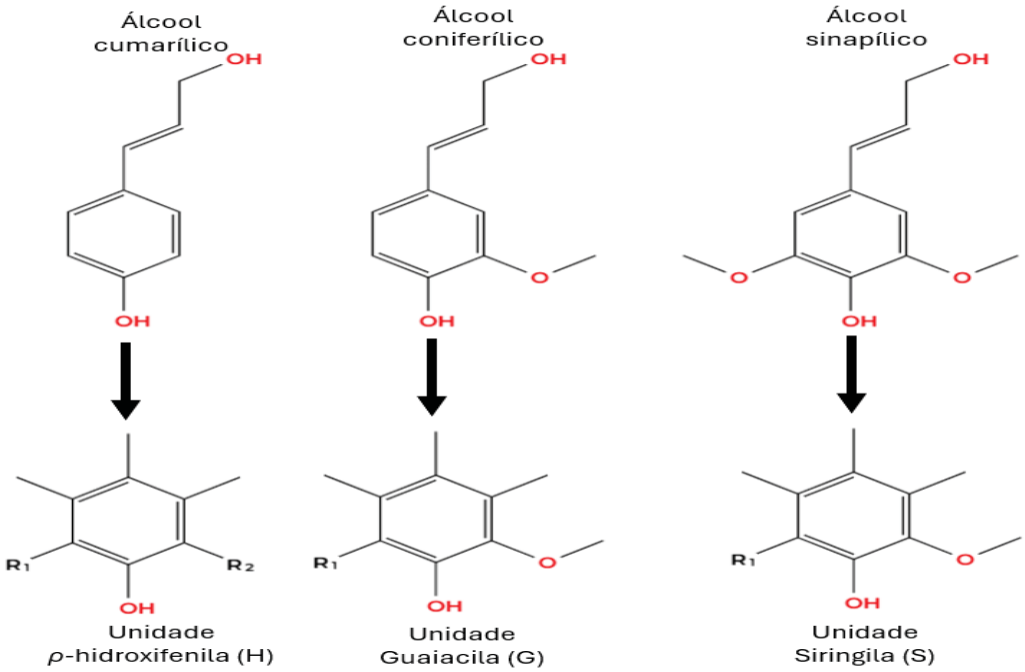
As hemiceluloses presentes em resíduos agrícolas, especialmente as xilanas, possuem grande potencial econômico. As principais possibilidades de uso incluem a extração e conversão em produtos como prebióticos (xilo-oligosacarídeos), poliois como o xilitol, compostos furânicos como o furfural e açúcares fermentáveis para a produção de etanol (MCKENDRY, 2002; BRIENZO, 2010; ZHANG *et al*., 2016).

As polioses se ligam covalentemente à lignina e ambas estão entrelaçadas (interações físicas) com a celulose na parede celular vegetal. Portanto, separá-las sem alterar significativamente sua estrutura é um desafio. Para isolar essas moléculas, é necessário um tratamento ou pré-tratamento para romper as ligações químicas (SUN *et al*., 2004; BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009).

3.7 LIGNINA

A lignina é um dos principais componentes da parede celular vegetal e seu nome vem do termo "lignum", que significa "madeira" (AGRAWAL; KAUSHIK; BISWAS, 2014). Estruturalmente, a lignina é denominada como uma macromolécula de natureza fenólica. Trata-se de uma estrutura tridimensional amorfa formada por várias unidades fenilpropanoides interligadas aleatoriamente por ligações éter e enlaces entre átomos de carbono. Essa macromolécula é formada por reações entre radicais livres derivados dos álcoois *p*-coumarílico, coniferílico e sinapílico, que correspondem à estrutura básica da lignina às unidades aromáticas *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e sirigila (S) (SUOTA *et al.,* 2021). A **Figura 6** mostra a estrutura dessas unidades da lignina.

Figura 6 - Principais unidades presentes na lignina.



Fonte: Adaptado de Silva (2014).

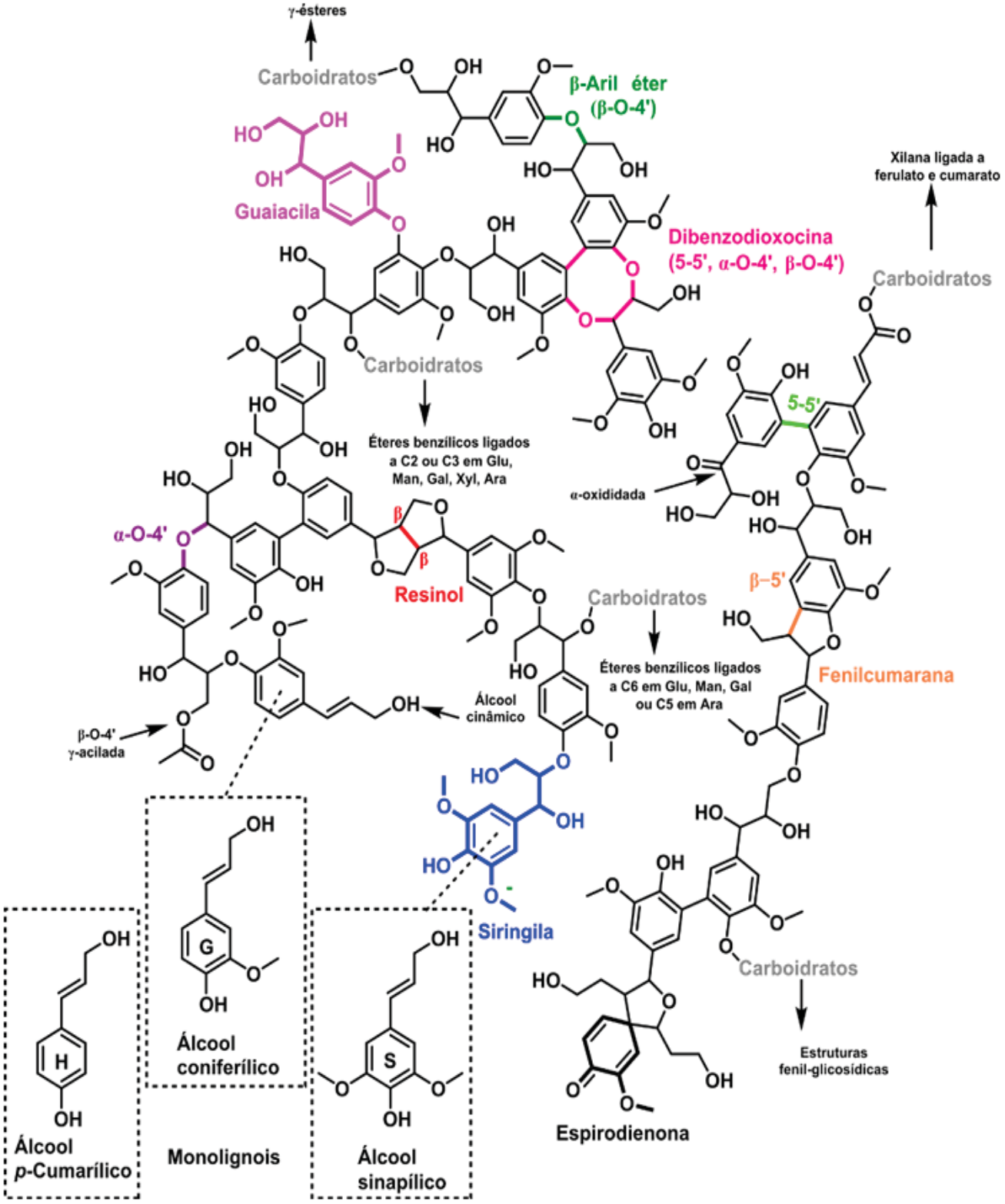
Em razão de suas ligações químicas e de sua interação entre a celulose e a hemicelulose, o papel da lignina na biomassa lignocelulósica é de assegurar elevada resistência mecânica e rigidez estrutural à parede celular vegetal, atribuindo-lhe maior integridade física, impermeabilidade à água e resistência à ação de agentes químicos e patógenos (TARASOV; LEITCH; FATEHI, 2021).

Dependendo de sua origem, as ligninas possuem diferentes proporções das unidades H, G e S, o que também determina o teor de grupos metoxílicos

em sua estrutura. Por exemplo, ligninas de gimnospermas (madeiras macias ou *softwoods*) são compostas principalmente por resíduos derivados do álcool coniferílico (unidades G) e baixos níveis de unidades H. Já as angiospermas dicotiledôneas (madeiras duras ou *hardwoods*) são predominantemente formadas pelos álcoois coniferílico e sinapílico, sendo chamadas de lignina GS. Em contraste, as ligninas de monocotiledôneas (gramíneas ou herbáceas), como a cana-de-açúcar, contêm os três precursores básicos em quantidades variáveis, sendo classificadas como ligninas HGS (RAMOS, 2003; SUOTA *et al*., 2021).

A estrutura da lignina é formada a partir de diferentes ligações carbono-carbono, que correspondem entre cadeias alifáticas (β-β', α-α', α-β'), anéis aromáticos (β-5', β-1', α-1', β-6') e entre carbonos aromáticos (5-5'). Também existe um complexo lignina-carboidrato com conexões entre várias ligações éter envolvendo cadeias alifáticas e anéis aromáticos (β-O-4', α-O-4') (RALPH; LAPIERRE; BOERJAN, 2019). A **Figura 7** esquematiza uma fração estrutural de uma lignina.

Figura 7 - Estrutura-modelo de uma lignina e suas principais ligações químicas.



Fonte: Adaptado de Suota *et al.*, (2021).

3.8 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A bioconversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol, bem como outros produtos de valor agregado e demais biocombustíveis é limitada devido à complexidade estrutural da associação de seus constituintes (lignina, hemicelulose e celulose), que apresentam alta resistência à degradação (MEIGHAN *et al*., 2017). Devido à esta recalcitrância da lignocelulose, para fazer o uso de seus principais componentes da biomassa, é imprescindível a realização de um pré-tratamento. Este processo deve promover a redistribuição e modificação da estrutura da biomassa pela diminuição do grau de associação molecular entre seus principais componentes, impactando diretamente no êxito das fases de hidrólise e fermentação microbiana (ZIAEI-RAD *et al*., 2021).

A escolha correta do pré-tratamento é crucial para uma melhor eficiência do processo. Na literatura, diversos autores têm apresentado técnicas para pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, incluindo métodos físicos, químicos, biológicos ou suas combinações (**Tabela 3**). A seleção do método a ser utilizado está diretamente relacionada ao resultado esperado, já que diferentes mecanismos de ação podem resultar na produção de variados produtos (RAMOS *et al*., 2019; GÜTSCH; NOUSIAINEN; SIXTA, 2012).

Segundo Zhu *et al.,* (2015) *e* Puligundla *et al.,* (2016)*,* de modo geral, as etapas de pré-tratamentos ideais devem ser eficazes na desconstrução das fibras de biomossas lignocelulósicas, acessíveis, economicamente viáveis, promover baixa decomposição de carboidratos e elevada digestibilidade da celulose, não gerar resíduos e ter baixo impacto ambiental.

Entre as principais técnicas utilizadas na etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, a explosão a vapor ganha destaque para o fracionamento de biomassas. As reações ocorrem quando o material é rapidamente aquecido pela introdução de vapor saturado a altas temperaturas, permanecendo em contato com o vapor por alguns minutos. Depois, é submetido a uma rápida descompressão até a condição atmosférica, sendo transferido para um ciclone acoplado a um vaso coletor (DUQUE *et al*., 2016; HOANG *et al*., 2023). O pré-tratamento por explosão a vapor pode ser realizado na ausência ou na presença de catalisadores exógenos, tendo destaque a impregnação da biomassa com soluções diluídas de H_2SO_4 ou H_3PO_4 (NEVES *et al.,* 2016).

Caso não sejam adicionados catalisadores exógenos ao sistema, o processo de explosão a vapor é chamado de auto-hidrólise, pois a quebra das ligações glicosídicas é catalisada pelo ácido acético liberado durante o processo de hidrólise dos grupamentos acetila das hemiceluloses. Todos os componentes da biomassa passam por hidrólise, mas as hemiceluloses são as mais suscetíveis a esse tipo de reação devido a sua natureza de baixa ordenação. Em altas temperaturas, os grupamentos acetila presentes nas hemiceluloses são hidrolisados a ácido acético, que catalisa a quebra das ligações do complexo lignina-carboidrato, resultando na liberação de monossacarídeos (arabinose, xilose e glucose) e oligossacarídeos hidrossolúveis no licor do pré-tratamento. Geralmente, sob condições menos severas, a celulose apenas sofre uma redução no seu grau de polimerização, permanecendo como resíduo fibroso (fração sólida ou C6), do qual a lignina despolimerizada pode ser extraída com solventes orgânicos ou meio alcalino. Com o aumento da severidade das condições operacionais, as reações de desidratação de carboidratos são favorecidas, levando à formação de compostos como hidroximetilfurfural, furfural, ácido fórmico e ácido levulínico, cuja presença pode inibir a produção de etanol celulósico em altos rendimentos (NEVES *et al*., 2016; RAMOS, 2000; HOANG *et al*., 2023).

Além dos efeitos relacionados à auto-hidrólise, também existem efeitos mecânicos de tensão de cisalhamento e de descompressão explosiva que ocasionam alterações físicas estruturais na biomassa lignocelulósica. De forma geral, a explosão a vapor provoca mudanças significativas nas propriedades da biomassa, como tamanho da partícula, porosidade, pH, repulsão à água (hidrofobicidade), densidade, entre outras (YU *et al*., 2022; DUQUE *et al*., 2016).

Os principais parâmetros operacionais para controle de auto-hidrólise são o tempo de residência da biomassa na câmara de reação e a temperatura. De acordo com estudos realizados por Overend *et al*. (1987), os autores desenvolveram um modelo matemático em que essas variáveis de processo são agrupadas em um único fator de severidade (S_0) conforme as Equações (1) e (2),

$$S_0 = logR_0 \tag{1}$$

$$R_0 = \int_0^t e^{\frac{T-100}{14,75}}\, dt \tag{2}$$

onde R_0 é a ordenada da reação, t (min) é o tempo de reação, T (°C) é a temperatura do processo e 14,75 é a energia de ativação em condições em que o processo segue uma cinética de primeira ordem. O fator de severidade é usalmente usado para comparar diferentes estudos relacionados à auto-hidrólise (RUIZ *et al*., 2021). Para este estudo, o fator de severidade é quantificado como 3,67 (t = 7,5 min; T = 195°C).

Tabela 3 - Principais técnicas de pré-tratamento para biomassas lignocelulósicas.

	Processo	**Descrição**
BIOLÓGICO	Fungo	Biodegradação da lignina por lacases e peroxidases. Alta seletividade em tempos de pré-tratamento muito longos.
	Bactéria	Uso de organismos geneticamente modificados.
	Enzimas	Remoção seletiva de componentes de alta massa molar em matrizes celulósicas usando lipases, oxirredutases e hidrolases.
FÍSICO	Moagem	Redução do tamanho de partícula e aumento da área de superfície do substrato para processos de conversão biológica ou química.
	Microondas	Ruptura e inchaço facilitando a remoção de hemiceluloses e lignina; tempos de aquecimento e de reação bastante reduzidos.
	Ultrassom	Modificação da estrutura por cavitação; ligações do complexo de lignina-carboidratos são clivadas.
QUÍMICO	Hidrólise ácida	Inchaço de celulose e hidrólise parcial de hemiceluloses; coalescência e condensação de lignina.
	Extração alcalina	Extração de lignina e hidrólise parcial de ligações aril-éter, reduzindo sua massa molar média.
	Líquido iônico	Extração de carboidratos ou lignina devido à sua alta polaridade e fortes interações intermoleculares com a matriz celulósica.
	Oxidação	Deslignificação com oxidantes fortes (hipoclorito, radicais de O_2 e O_3).
	CO_2 supercrítico	Hidrólise ácida parcial de hemiceluloses, redução da cristalinidade da celulose aumentando a acessibilidade do substrato.
COMBINADO	Explosão a vapor	Hidrólise ácida de hemiceluloses, modificação e redistribuição de lignina, realizado na ausência ou presença de catalisadores ácidos ou básicos.
	Organosolv	Deslignificação seletiva da biomassa, cuja eficiência pode ser aumentada pela adição de um catalisador ácido exógeno.
	AFEX (*Ammonia fibre expansion)*	Remoção parcial de hemiceluloses e lignina; mudanças no estado cristalino da celulose (de I para III).
	Polpação kraft	Deslignificação alcalina a ~170°C usando Na_2S/NaOH para isolar fibras de celulose (holocelulose).

Fonte: Adaptado de RAMOS *et al*., (2019).

O uso de fluidos pressurizados, como o vapor de água, sendo o meio de reação principal para facilitar processos integrados, como separação, despolimerização e reações químicas da celulose, é considerado uma técnica ambientalmente benéfica (APARICIO *et al*., 2021). Isso ocorre porque a água superaquecida e sob alta pressão é um excelente solvente, pois ocorre diminuição na sua constante dielétrica com o aumento da temperatura e pressão, aproximando-se da de solventes orgânicos polares. Isso permite que a água, em seu estado superaquecido, dissolva compostos orgânicos e quebre ligações mais eficazmente do que em condições normais, além de proporcionar uma solução não tóxica e limpa para a hidrólise da celulose (WANG *et al*., 2023). Sob a perspectiva da economia de energia, o método de explosão a vapor apresenta uma vantagem clara sobre outros processos, pois requer menos água por unidade de biomassa. Especificamente, o pré-tratamento por explosão a vapor pode ser realizado com cerca de 1,5 kg de água por kg de biomassa (HOANG *et al*., 2023).

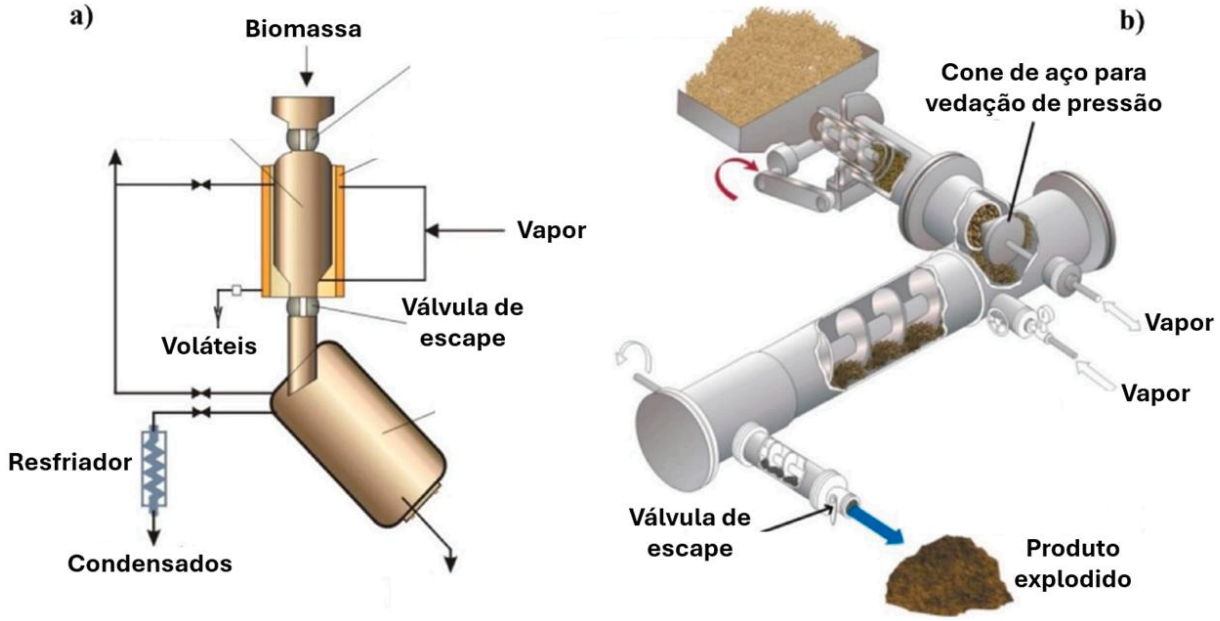
Além disso, diferentes componentes da biomassa podem ser convertidos usando um meio de reação semelhante. A liberação de pressão durante a fase de expansão proveniente do método de explosão a vapor promove a ruptura da estrutura da biomassa, demonstrando que taxas de reação mais altas são possíveis com menor transferência de massa. Abordagens referentes a esse método também podem explorar as propriedades ajustáveis do meio de reação utilizado, funcionando como um potencial de controle para regular a seletividade das reações químicas e limitar a formação de subprodutos indesejados (AKIZUKI *et al*., 2014).

Ademais, a utilização de catalisadores ácidos ou enzimáticos em conjunto com o método de explosão a vapor pode intensificar ainda mais a eficiência do processo de conversão da biomassa. Esses catalisadores atuam de maneira sinérgica, facilitando a quebra das ligações internas da lignina e hemicelulose, o que resulta em uma liberação mais eficiente de açúcares fermentáveis. Com a otimização dos parâmetros de reação, como temperatura, tempo de residência e composição do meio reacional, é possível alcançar um balanço ideal entre a maximização da produção de etanol e a minimização de subprodutos, aumentando a viabilidade econômica do processo.

Na explosão a vapor, diversos tipos de reatores são frequentemente utilizados para processar a biomassa lignocelulósica, como reatores de batelada, semi-

contínuos e contínuos. No entanto, reatores contínuos e de batelada são os mais comuns para esse pré-tratamento da biomassa, conforme ilustrado na **Figura 9**.

Figura 8 - Configuração de reatores para o pré-tratamento por explosão a vapor de biomassa: (a) - Reator em batelada, (b) - Reator contínuo.



Fonte: Adaptado de Hoang *et al*., (2023).

Em um reator de batelada, o pré-tratamento por explosão a vapor envolve aquecer a biomassa sob altas pressões e temperaturas. Após isso, a biomassa pré-tratada é mecanicamente desintegrada por meio de uma descarga violenta em um tanque de coleta. Para operações em escala laboratorial, o pré-tratamento por explosão a vapor com reatores de batelada é geralmente preferido, pois requer menos alterações nas condições de pré-tratamento, incluindo o uso de produtos químicos e biomassa (RAMOS, 2003; RUIZ *et al*., 2020).

Para operações de pré-tratamento a vapor em sistemas contínuos, a biomassa é automaticamente transferida do silo de armazenamento para o digestor usando dispositivos de alimentação contínua, como um alimentador coaxial, criando uma área de alta compressão que sela o reator. Um parafuso de ajuste fino controla a entrada da biomassa no corpo do reator, onde é transportada por uma rosca helicoidal ou rotativa. Nesta parte do reator, vapor saturado é injetado através de bicos injetores,

iniciando o processo de cozimento da biomassa. A biomassa percorre todo o reator, permanecendo na temperatura especificada pelo tempo necessário. Uma rosca helicoidal, dimensionada conforme as propriedades físico-químicas do produto, movimenta a biomassa pré-tratada em uma nova área de alta pressão, que é periodicamente aliviada pela abertura de uma válvula de esfera. Assim, a pasta termoquímica resultante é direcionada para um tanque de lavagem através de uma linha de transferência, antes de ser encaminhada para a etapa de hidrólise enzimática. Em comparação com o processo em batelada, desenvolver reatores contínuos para esse método permite um controle mais preciso dos parâmetros de pré-tratamento, o que é crucial para alcançar condições ideais de processamento em altas temperaturas e obter maior pureza das composições extraídas, devido às limitações na transferência de calor, resultando em menor formação de subprodutos indesejados (RAMOS, 2003; HOANG *et al*., 2023).

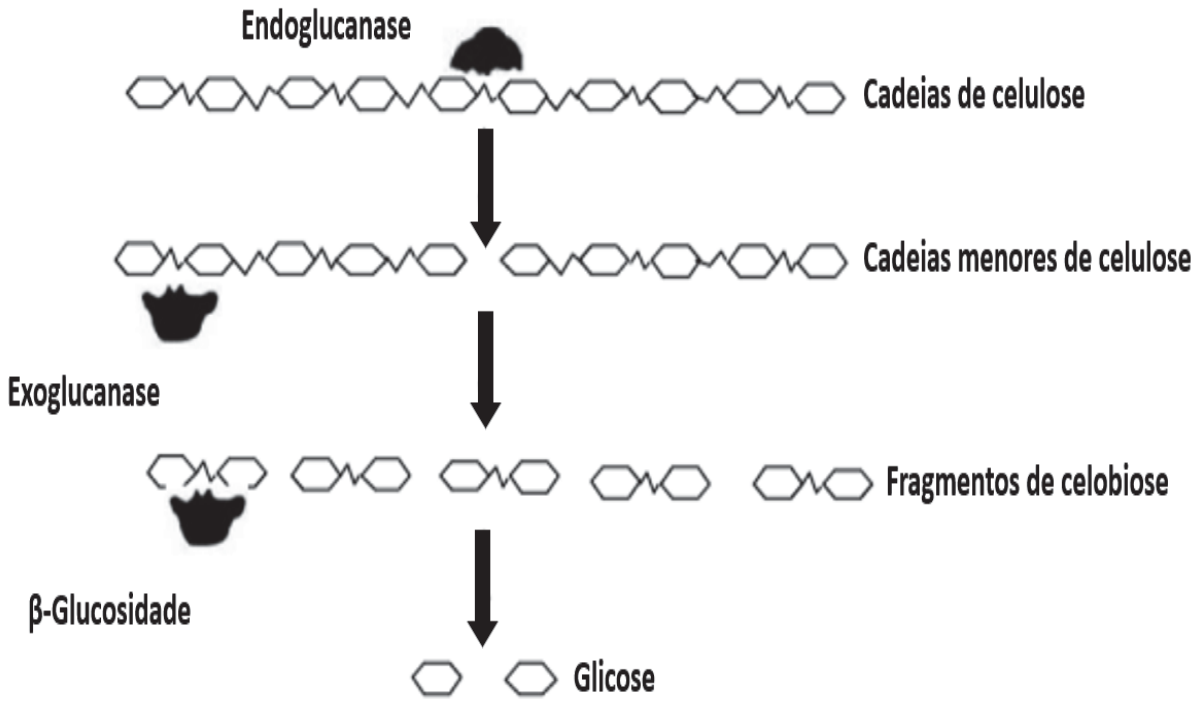
3.9 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

3.9.1 Enzimas utilizadas e sua ação sinérgica

Após a etapa de pré-tratamento sob condições adequadas, a biomassa pode ser submetida à hidrólise pela ação de enzimas responsáveis pela degradação da celulose, denominadas celulases. Estas proteínas celulolíticas são biocatalisadores específicos que atuam em conjunto para liberação de carboidratos passíveis de fermentação a partir da conversão dos polissacarídeos presentes na biomassa (CASTRO; PEREIRA, 2010). A matriz celulósica é composta majoritariamente por três grupos de celulases: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β- glucosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glucose (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). Estas enzimas são produzidas por um espectro de bactérias, fungos aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos, protozoários, tendo os fungos filamentosos como a mais importante fonte comercial, no qual as celulases mais utilizadas industrialmente são derivadas do fungo *Trichoderma reesei* (ZHANG; HAN; DONG, 2021). A endoglucanase, segundo a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB, 2024), possui como nome sistemático, 1,4-β-D-glucana-4-glucanohidrolase.

Esta enzima celulolítica é responsável por iniciar o processo de hidrólise. Ela atua hidrolisando aleatoriamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra de celulose, liberando oligossacarídeos com vários graus de polimerização (GP) e criando novos terminais, um redutor (quando a glucose tem uma hidroxila heterossídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterossídica da molécula terminal está ligada a uma glucose adjacente). A EnG é a enzima que promove a rápida solubilização do polímero celulósico (redução do GP), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (CASTRO; PEREIRA, 2010). Em seguida, tem-se a ação das exoglucanases, também denominadas celobiohidrolases (CBH) que atuam de forma progressiva em regiões terminais redutoras (CBHI) e não redutoras (CBHII), promovendo a sua despolimerização gradativa pela remoção de unidades de celobiose. Para exercer a sua atividade biocatalítica, as exoglucanases exigem que a cadeia de celulose adentre no seu túnel catalítico, promovendo a solubilização gradual do substrato. O terceiro e último grande grupo de enzimas do complexo celulolítico engloba a β-glucosidase, ou β-glicosídeo gluco-hidrolase, que é seu nome sistemático (IUBMB, 2024). A **Figura 9** mostra a ação sinérgica entre exoglucanases, endoglucanase e β-glucosidase na hidrólise da fibracelulósica.

Figura 9 - Modo de ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico.



Fonte: Adaptado de Castro e Pereira (2010).

A BG tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) em glucose (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; LYND; ZHANG, 2002). Vale ressaltar que, assim como a CBH, também é reportada com a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise. As enzimas são suscetíveis à inibição pelo acúmulo de produto; assim, a glucose liberada inibe as β-glucosidades, acarretando a inibição das exoglucanases devido ao acúmulo de celobiose e comprometendo a eficiência do sinergismo endo-exo (SILVEIRA *et al*., 2015; PIRICH *et al*., 2020). Quando trabalham em conjunto, as enzimas do complexo celulolítico têm um desempenho superior ao que seria esperado pela soma de seus rendimentos individuais, ou seja, quando atuam separadamente uma das outras. Esse fenômeno é conhecido como sinergia ou ação sinérgica.

3.9.2 Etapas de reação e fatores que afetam a hidrólise enzimática

Durante a hidrólise enzimática, mecanismo de reação e fenômenos de transferência de massa são recorrentes no processo. As etapas de reação durante a hidrólise da celulose ocorrem da seguinte forma: a adsorção das celulases na superfície da celulose, seguida pela formação de um complexo enzima-substrato ativo, a hidrólise da celulose com a liberação de produtos e, finalmente, a dessorção das celulases de para o meio (AGRAWAL *et al*., 2021; GUO *et al*., 2023; ZHANG *et al*., 2021). Conforme a necessidade de adsorção das enzimas ao substrato, uma parte significativa das celulases possui um módulo de ligação a carboidratos, conhecido como CBM (Carbohydrate Binding Module), que se conecta ao domínio catalítico por meio de um peptídeo flexível. Os CBMs desempenham um papel crucial ao reconhecer os diferentes componentes da parede celular vegetal, aumentando significativamente a atividade das enzimas. Eles facilitam a aproximação entre o domínio catalítico das enzimas e as cadeias de celulose localizadas na superfície do substrato (ZHANG *et al*., 2021; GUO *et al*., 2023).

Para assegurar altos níveis de conversão, os complexos enzimáticos podem incluir tanto enzimas auxiliares quanto proteínas não catalíticas. Entre as enzimas auxiliares mais importantes estão as monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), que desempenham o papel de quebrar ligações glicosídicas por meio de uma reação de oxidação (GUO *et al*., 2023). Por sua vez, as proteínas não

catalíticas, chamadas de indutoras de amorfogênese, têm um papel crucial ao facilitar a ação das endoglucanases. Um exemplo de proteína auxiliar é a suolenina, que tem a capacidade de romper as ligações de hidrogênio na estrutura cristalina da celulose, aumentando a acessibilidade das celulases ao substrato (AGRAWAL *et al*., 2021). Mesmo que condições adequadas sejam aplicadas durante o pré-tratamento, parte das hemiceluloses podem permanecer na estrutura da biomassa.

Para que a hidrólise completa dos carboidratos presentes na biomassa pré-tratada funcione de forma eficiente, é necessária a adição de outro coquetel enzimático, as hemicelulases. Estas são divididas, por exemplo, em xilanases, glucomanases, galactomanases, β-xilosidases, entre outras, cuja presença depende da natureza química das hemiceluloses remanescentes (GUO *et al*., 2023).

Devido à natureza da reação heterogênea da hidrólise enzimática, fenômenos de transferência de massa influenciam a cinética da reação ocasionada pela mobilidade das enzimas sobre o efeito de solvatação na estrutura da biomassa. A camada estagnada de filme líquido solvata as partículas sólidas do material lignocelulósico e, em sequência, ocorre a difusão das enzimas na superfícia da matriz (AGRAWAL *et al*., 2021). Desta forma, a velocidade global de reação é influenciada por fenômenos de resistência à transferência de massa. No início da hidrólise, a reação é determinada por três etapas: a rápida adsorção de celulases nas regiões prontamente acessíveis da superfície do substrato, seguida por uma fase intermediária onde a velocidade de reação é moderada, alcançando conversões de 50 a 70% do substrato, e, finalmente, a desaceleração da hidrólise quando são atingidos altos graus de conversão (SUN *et al*., 2022; AGRAWAL *et al*., 2021; RAMOS *et al*., 2020).

A velocidade de reação da hidrólise enzimática apresenta uma gradativa redução ao longo do tempo, podendo estar relacionada às características dos substratos utilizados. Entre as principais características, destacam-se o tamanho da partícula, a área superficial, o tamanho dos poros, grau de cristanilidade e polimerização, quantidade de lignina e presença de agentes inibitórios (ZHANG *et al*., 2021; RAMOS *et al*., 2020). Por vezes, essas características também podem estar associadas diretamente ao pré-tratamento realizado. Conforme mencionado no item 3.4 deste trabalho, a celulose possui duas regiões: a cristalina e a amorfa. A primeira refere-se a uma estrutura tridimensional organizacional compacta, que

dificulta o acesso enzimático e, consequentemente, reduz a taxa de hidrólise. Em contrapartida, a região amorfa apresenta uma forma estrutural desorganizada, que facilita o acesso das enzimas e eleva a taxa de reação da hidrólise.

Inúmeras pesquisas indicam que a região cristalina da celulose pode afetar diretamente a eficiência à suscetibilidade do substrato, podendo hidrolisar até 30 vezes menos se comparada as regiões amorfas (AGRAWAL *et al*., 2021). Vale ressaltar que essa suscetibilidade pode depender de vários fatores, como a estrutura do substrato, a presença de inibidores, as condições do meio reacional e o volume e tamanho dos poros, que apresentam um papel curcial na adsorção e difusão das enzimas, sendo esperado que essas possam se difundir apenas em poros maiores que o raio hidrodinâmico da enzima (AGRAWAL *et al*., 2021; ZHANG *et al*., 2021).

A presença de lignina e seus precursores também podem afetar significativamente o acesso das celulases ao substrato. A lignina pode inibir a ação das enzimas de três maneiras diferentes, dependendo de sua concentração e distribuição: atuando como uma barreira física que limita a acessibilidade das enzimas, causando a adsorção não produtiva das enzimas na lignina, e levando à desativação devido à presença de compostos fenólicos derivados da lignina (GUO *et al*., 2023; AGRAWAL *et al*., 2021; RAMOS *et al*., 2020).

Li *et al*. (2018) investigaram o impacto de diferentes tipos de lignina na sacarificação da biomassa. Eles descobriram que a lignina obtida pelo processo *organosolv* formava ligações não produtivas com as enzimas, diminuindo a disponibilidade de enzimas livres para a hidrólise. Em contraste, a lignina do processo kraft, que se deposita na superfície da celulose, restringia significativamente a interação das enzimas com a matriz. Qin *et al*. (2016) também estudaram a hidrólise enzimática, observando que a adição gradual de compostos fenólicos, como a vanilina, resultava em uma diminuição da conversão de 53% para 26% quando a concentração de vanilina aumentava de 0 para 10 $mg \cdot mL^{-1}$. Além disso, fatores como a inibição retroativa devido ao acúmulo de produtos da reação, a desnaturação térmica e a perda de atividade enzimática por cisalhamento durante a agitação podem impactar negativamente a hidrólise enzimática. Esses desafios são exacerbados por altas cargas de sólidos, que são essenciais para a viabilidade econômica da produção de etanol celulósico (DENG *et al*., 2023; AGRAWAL *et al*., 2021).

Quando a hidrólise é realizada com altas cargas de sólidos, grandes

quantidades de biomassa são adicionadas ao meio reacional, reduzindo a quantidade de água livre disponível, o que dificulta a transferência de massa e torna o processo menos eficiente. No entanto, cargas de sólidos superiores a 15% são necessárias para alcançar concentrações de açúcares adequadas para um processo fermentativo eficiente (DENG *et al*., 2023; SUN *et al*., 2022; RAMOS *et al*., 2020). A água desempenha um papel crucial na distribuição de calor e enzimas no meio de reação. Em concentrações de sólidos acima de 20%, formam-se suspensões densas com interações fibrilares predominantes, onde a fração líquida é absorvida pela biomassa, aumentando a viscosidade e a demanda energética para a mistura (RAMOS *et al*., 2020). Altas cargas de sólidos também podem causar perfis de concentração desiguais, e rendimentos de hidrólise podem ser inferiores a 60% quando o teor de sólidos ultrapassa 25% (SUN *et al*., 2022).

3.9.3 Estratégias de otimização da hidrólize enzimática

Diversas estratégias podem ser utilizadas para mitigar os problemas que afetam a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, como a adição de surfactantes para reduzir a viscosidade, a implementação de um sistema de operação em batelada alimentada e a otimização do sistema de agitação (SUN *et al*., 2022; DENG *et al*., 2023). No processo de batelada alimentada, o material é adicionado gradualmente ao reator, aumentando a disponibilidade de água para as enzimas, melhorando a eficiência da hidrólise e permitindo maiores concentrações de açúcares. Esta técnica também ajuda a minimizar problemas de transferência de calor e massa durante a hidrólise (RAMOS *et al*., 2020; PINO *et al*., 2018).

Xu *et al*. (2019) conduziram uma hidrólise enzimática com um teor de sólidos totais de 22%, utilizando um sistema de batelada alimentada com bagaço de cana-de- açúcar pré-tratado com solução alcalina. Eles aplicaram baixas dosagens de celulases (4 $FPU \cdot g^{-1}$ de biomassa), acompanhado de enzimas acessórias e surfactantes não iônicos, alcançando um rendimento de 80% e 122 $g \cdot L^{-1}$ de glucose após 48 h. A FPU (Filter Paper Unit) é uma unidade de medida usada para quantificar a atividade enzimática de celulases, capazes de decompor a celulose em açúcares simples como a glucose. Essa unidade foi desenvolvida para padronizar a avaliação da atividade enzimática em experimentos de hidrólise de celulose. Cai *et al*. (2021) propuseram a hidrólise enzimática de espigas de milho, pré-tratadas

quimicamente, em um sistema de batelada alimentada, com um teor final de sólidos de 25% e 7,3 FPU·g^{-1} de celulases. Eles testaram três modos de alimentação em batelada, sendo o mais eficiente o que iniciou a reação com 10% de sólidos, seguido de adições sequenciais de 3% a cada 5 h, resultando em um rendimento de 84,4% e uma concentração de 131,7 g·L^{-1} de glucose em 96 h.

Para complementar a discussão sobre a otimização do processo de hidrólise enzimática em biorreatores de tanque agitado, é essencial considerar o papel dos aditivos na melhoria da eficiência do processo. Recentemente, Zhang *et al*. (2022) investigaram o uso de surfactantes para reduzir a tensão superficial e aumentar a eficiência de mistura no meio reacional. Eles descobriram que a adição de surfactantes não iônicos, como o Tween 80, resultou em um aumento significativo na taxa de hidrólise enzimática, com melhorias de até 20% na liberação de glucose. Essa abordagem é particularmente eficaz em altas cargas de sólidos, onde a viscosidade do meio é um desafio crítico. Os surfactantes ajudam a dispersar melhor as enzimas na matriz sólida, facilitando a interação enzimática e a quebra de celulose em açúcares fermentáveis (ZHANG *et al*., 2022).

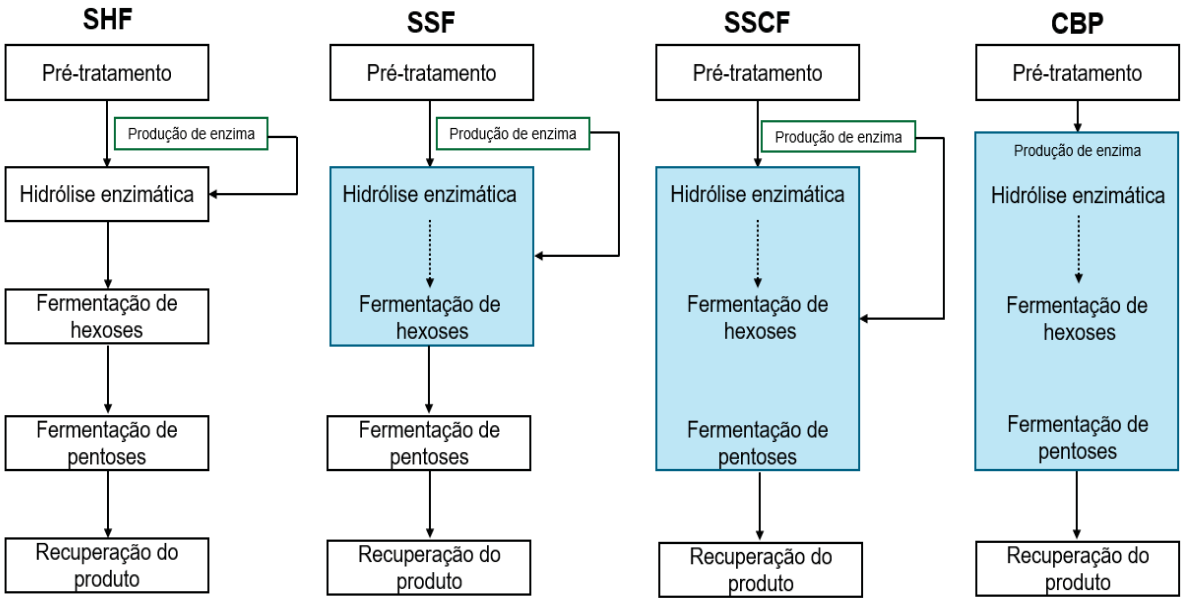
Outra estratégia relevante é a aplicação de pré-tratamentos físicos e químicos que modificam a estrutura da biomassa, tornando-a mais acessível às enzimas. Liu *et al*. (2021) estudaram o efeito do pré-tratamento com ácido diluído seguido de explosão a vapor em diferentes tipos de biomassa lignocelulósica. Os resultados mostraram que esse método não apenas aumentou a superfície específica da biomassa, mas também removeu parcialmente a lignina, que é um inibidor natural das enzimas de hidrólise. A combinação de pré-tratamento ácido e explosão a vapor melhorou a conversão enzimática em mais de 30%, destacando a importância de abordagens integradas para a otimização do processo (LIU *et al*., 2021). Adicionalmente, essas técnicas de pré-tratamento são complementares às melhorias no design do biorreator e na formulação enzimática, proporcionando um avanço significativo na produção de etanol de segunda geração (LIU *et al*., 2021; ZHANG *et al*., 2022).

4 PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A eficiência econômica da produção de etanol celulósico depende significativamente da otimização das etapas de hidrólise enzimática e fermentação.

Diversas configurações foram desenvolvidas até o presente momento, sendo que as quatro principais estão ilustradas na **Figura 10**, a qual sugere a execução dessas duas etapas de forma separada ou conjunta.

Figura 10 - Configurações disponíveis para o processamento da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Parisutham; Kim e Lee (2014).

A Hidrólise Enzimática Separada da Fermentação (*Separate Hydrolysis and Fermentation* - SHF) permite um controle mais preciso das condições operacionais, uma vez que as duas etapas ocorrem em unidades distintas. A principal vantagem desse processo é a possibilidade de realizar cada etapa em suas condições ideais de temperatura, sendo que a atividade enzimática é otimizada em temperaturas mais altas (45-50°C) e a fermentação em temperaturas mais baixas (28-30°C) (PARISUTHAM; KIM; LEE, 2014). Adicionalmente, a lignina pode ser facilmente recuperada após a hidrólise por filtração, o que facilita seu uso para fins energéticos ou outras aplicações mais valiosas. No entanto, esse método apresenta desvantagens como o alto custo de produção, baixa produtividade, alto risco de contaminação e possível inibição da ação das celulases pelos produtos da reação (VELASQUEZ- ORTA *et al*., 2022).

Na Sacarificação e Fermentação Simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Fermentation* - SSF), as reações ocorrem em um único reator. Essa configuração reduz significativamente o tempo de processamento, pois a fermentação dos açúcares acontece à medida que são liberados pela hidrólise enzimática. Isso minimiza os problemas de inibição enzimática devido ao acúmulo

de mono e dissacarídeos. A principal desvantagem desse processo é a incompatibilidade das condições ótimas de pH e temperatura para as etapas de hidrólise e fermentação, além da lignina de hidrólise ser mais contaminada com biomassa microbiana e outros componentes do meio (ISHIZAKI; HASUMI, 2014).

Vale ressaltar que tanto SHF quanto SSF podem incluir a cofermentação de hexoses e pentoses, sendo então denominados SHCF (*Separate Hydrolysis and Cofermentation*) e SSCF (*Simultaneous Saccharification and Co-fermentation*), respectivamente. Esse processo pode ser realizado por um único microrganismo geneticamente modificado ou por vários microrganismos simultaneamente. A utilização eficiente das pentoses é crucial para aumentar os rendimentos e a viabilidade econômica do processo, e um dos principais desafios da indústria de etanol celulósico é a disponibilidade de microrganismos capazes de metabolizar pentoses e hexoses de forma eficiente (ALMEIDA e NASCIMENTO, 2021).

Uma alternativa proposta é o bioprocessamento consolidado (CBP), que utiliza um único microrganismo para produzir enzimas, realizar a sacarificação e a fermentação em uma única etapa. Essa abordagem promete melhorar a eficiência do processo, eliminar a necessidade de adição de enzimas externas, minimizar a inibição das celulases e reduzir o custo total do processo devido à eliminação de várias operações unitárias (PARISUTHAM *et al*., 2014). Apesar do potencial, o CBP ainda está em fase inicial de desenvolvimento, principalmente devido às limitações relacionadas ao uso de um único microrganismo capaz de realizar todas as etapas eficientemente (PARISUTHAM; KIM; LEE, 2014).

4.1 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS

A fermentação é a fase em que açúcares são convertidos em etanol e outros compostos através de reações metabólicas conduzidas por microrganismos. Para serem adequados na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, os microrganismos precisam ser termotolerantes, resistentes a inibidores e possuir alta eficiência na fermentação de carboidratos simples como glucose e xilose (CUNHA *et al*., 2020; GUO; CHANG; LEE, 2018; LUONG, 1984). Na indústria, a fermentação da glucose (hexose) é amplamente dominada, com *S. cerevisiae* sendo a levedura mais utilizada na fermentação da sacarose, produzindo etanol de primeira geração (CUNHA *et al*., 2020). O aproveitamento completo dos açúcares

presentes na biomassa (hexoses e pentoses) é essencial para tornar a produção de etanol lignocelulósico competitiva economicamente (LIU *et al*., 2019). Nesse contexto, pesquisas focam na seleção e aprimoramento de microrganismos que fermentam hexoses e pentoses. Como exemplo, esforços significativos são feitos para modificar geneticamente *S. cerevisiae* para fermentação de xilose (CUNHA *et al*., 2020; NDUBUISI *et al*., 2023). Várias espécies de leveduras possuem genes que codificam o consumo e metabolização de pentoses, mas apenas uma pequena parte consegue convertê-las em etanol. Entre essas estão *Pichia stipitis, Candida shehatae, Pachysolen tannophilus, Hansenula polymorpha, Kluyveromyces marxianus, Pichia kudriavzevii e Spathaspora passalidarum* (NDUBUISI *et al*., 2023). Entre as leveduras não convencionais, *Kluyveromyces marxianus* destaca-se pela produção de etanol a partir de glucose em altas temperaturas (40 a 45°C), característica vantajosa para processos SSF (NDUBUISI *et al*., 2023; BAPTISTA e DOMINGUES, 2022).

No contexto do bioprocessamento consolidado (CBP), algumas bactérias termofílicas anaeróbicas celulolíticas, como *Thermoanaerobium mathranii, T. ethanolicus, T. brockii, Clostridium thermosaccharolyticum, C. thermohydrosulfuricum*, e fungos filamentosos como *Fusarium oxysporum*, são consideradas promissoras (GUO; CHANG; LEE, 2018).

Apesar de vários microrganismos terem capacidade fermentativa, nenhum deles atinge os níveis de rendimento e robustez da levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae*. Seu uso extensivo em fermentações industriais resultou em alta capacidade fermentativa e resistência a condições adversas, incluindo altas concentrações do próprio etanol produzido, tornando-a alvo frequente de modificações genéticas para viabilizar economicamente as usinas de segunda geração (CUNHA *et al*., 2020).

Outro fator crucial para maximizar a produção de E2G, além da escolha do microrganismo utilizado, é a otimização das condições de fermentação a partir de hidrolisados enzimáticos. Isso inclui o controle rigoroso de parâmetros como pH, temperatura, concentração de substrato e oxigênio dissolvido. A manutenção do pH em níveis ótimos, geralmente em torno de 5,0, é essencial para a atividade das leveduras e para evitar a inibição do crescimento microbiano. A temperatura deve ser cuidadosamente controlada para equilibrar a atividade enzimática e a viabilidade das leveduras, sendo comum a utilização de temperaturas entre 30°C e

35°C. Além disso, a concentração de substrato deve ser ajustada para evitar efeitos inibitórios causados por altas concentrações de açúcares ou produtos intermediários da fermentação. A aeração mínima é necessária para manter a saúde das células de levedura, especialmente em processos que envolvem microrganismos modificados geneticamente para fermentação de pentoses (PARISUTHAM; KIM; LEE, 2014b; LUONG, 1984).

A escolha do microrganismo fermentador é um fator decisivo na eficiência da fermentação alcoólica de hidrolisados enzimáticos. *S. cerevisiae* continua sendo o microrganismo preferido devido à sua robustez e capacidade de fermentar eficientemente a glucose. No entanto, esforços significativos têm sido direcionados para o desenvolvimento de cepas capazes de metabolizar xilose e outros açúcares de cinco carbonos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos. Estratégias de engenharia genética, como a inserção de genes de transporte e metabolismo de pentoses, têm sido empregadas para melhorar a capacidade fermentativa dessas leveduras. Além das modificações genéticas, técnicas de evolução adaptativa são utilizadas para selecionar cepas com maior tolerância a inibidores e melhor desempenho em condições industriais. Esses avanços são fundamentais para a viabilização comercial do etanol de segunda geração, que depende da conversão eficiente de todos os açúcares presentes na biomassa (GUO; CHANG; LEE, 2018).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentadas todas as metodologias empregadas na preparação, caracterização química, pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação da biomassa, bem como os respectivos insumos e equipamentos utilizados. As metodologias para as análises químicas empregadas estão de acordo com as normas adotadas pelo NREL (*National Renewable Energy Laboratory*), enquanto as metodologias para a hidrólise enzimática e explosão a vapor foram embasadas em estudos já realizados no Centro de Pesquisa em Química Aplicada da Universidade Federal do Paraná.

5.1 PRINCIPAIS ETAPAS DO TRABALHO

As principais etapas deste trabalho estão ilustradas na **Figura 11**, sendo possível observar a sequência dos principais experimentos executados para concluir os objetivos específicos propostos no item 2.2.

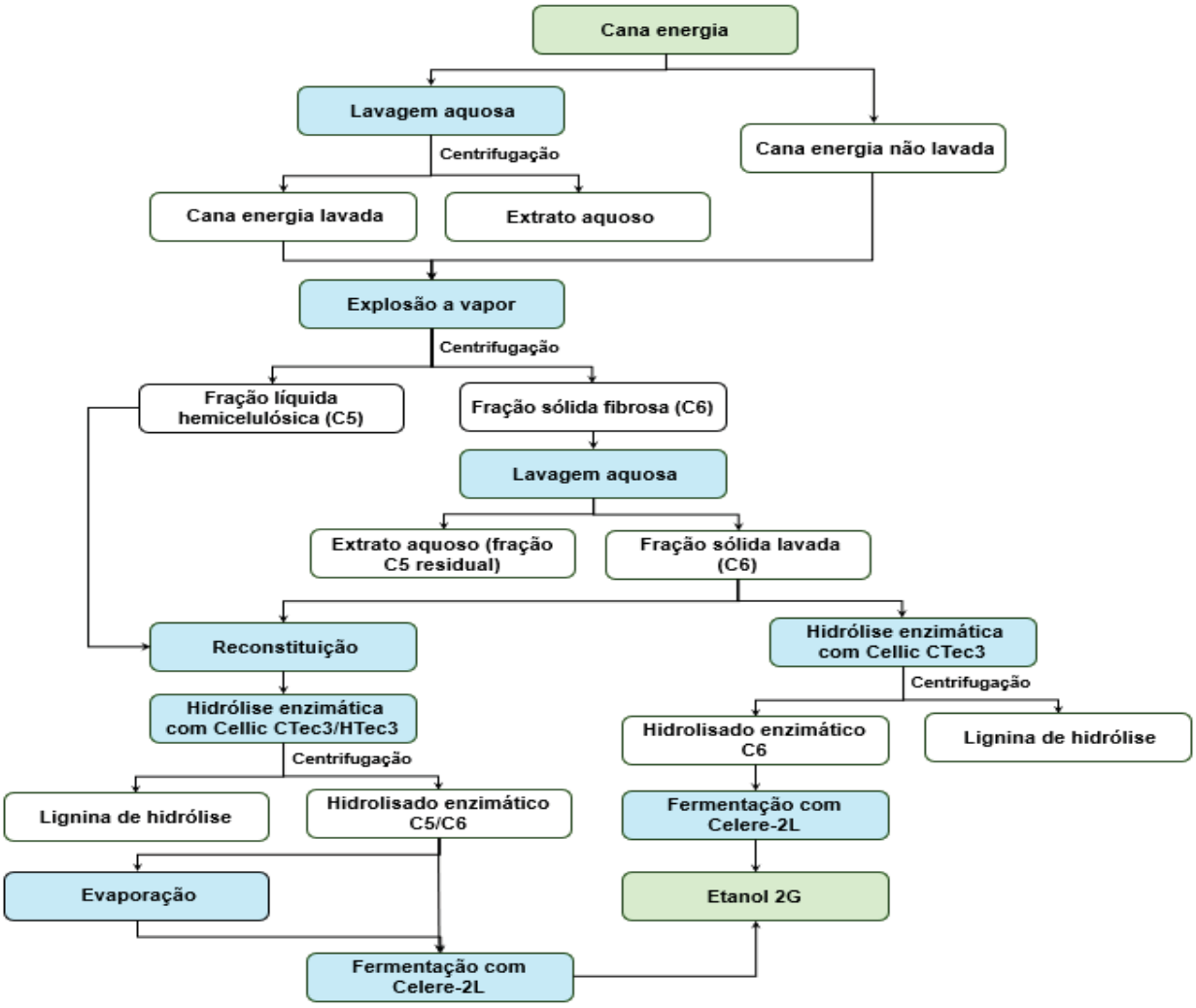
5.2 MATERIAL

A biomassa de cana energia utilizada nesta pesquisa foi fornecida pela empresa Granbio, localizada em Barra de São Miguel, Alagoas, Brasil. Os materiais utilizados são da safra 2022/2023. As amostras incluíam uma variedade de cana energia chamada Vertix 11. Essa biomassa foi gerada através de um processo de moagem em uma estação experimental para a extração de sacarose e, após a extração, foi seca e prensada. Diferentemente do bagaço de cana-de-açúcar convencional, que é um resíduo industrial proveniente da moagem de variedades destinadas à produção de açúcar e etanol de primeira geração e que consiste majoritariamente no material fibroso do colmo sem a presença de folhas, palha ou ponteiros, a biomassa utilizada neste estudo compreende uma fração mais ampla da planta, incluindo o bagaço propriamente dito, as palhas e outros resíduos agrícolas associados, característica típica da cana-energia cultivada para aproveitamento integral em processos de conversão de biomassa.

Para os procedimentos de hidrólise, foi utilizada a preparação enzimática

Cellic CTec3 e HTec3 fornecida pela empresa Novonesis (Araucária, Brasil). No ensaio de fermentação, foi empregada a levedura Celere-2L (Bio-Celere Agroindustrial, São Paulo, SP, Brazil) a partir do meio de cultura. Os principais reagentes utilizados incluíram ácido sulfúrico (98%, Tedia), álcool etílico (95%, Êxodo), ácido acético (37%, Neon), acetato de sódio (P.A., Neon) e padrões cromatográficos (Sigma). Outros reagentes foram adquiridos conforme especificação exigida pelos métodos utilizados.

Figura 11 - Principais etapas do projeto proposto para a obtenção de etanol celulósico a partir da biomassa de cana energia Vertix 11.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA

5.3.1 Lavagem do material

Para a remoção e subsequente quantificação da sacarose residual nas biomassas de cana energia, as amostras foram lavadas com água a 50°C durante 1 h, utilizando um teor de sólidos de 2% ($m \cdot V^{-1}$). Após essa etapa, alíquotas foram coletadas para a quantificação da sacarose residual por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras e padrões foram injetados em um sistema cromatográfico de íons da Metrohm, modelo 850 Professional, equipado com um amostrador automático modelo 919 IC Plus e um detector de amperometria de pulso. A coluna utilizada foi a CarboPac PA100 da Dionex, com eluição isocrática de NaOH 12 $mmol \cdot L^{-1}$ em fluxo de 0,7 $mL \cdot min^{-1}$. Com esse sistema é possível quantificar a glucose, frutose e sacarose.

Vale ressaltar que uma parcela das amostras de cana energia utilizadas neste estudo não passaram pelo processo de lavagem aquosa antes do pré-tratamento, conforme a **Figura 11**, para subsequente comparação com o material lavado.

5.3.2 Determinação de umidade

A determinação do teor de umidade foi baseada no método gravimétrico da norma NREL/TP-510-4261, empregando uma balança de secagem por radiação infravermelha (Shimadzu, modelo MOC63u) (SLUITER *et al*., 2008b). As análises foram realizadas em triplicata e a umidade (TU) foi calculada utilizando a Equação (3),

$$TU(\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \qquad (3)$$

onde m_i representa a massa da biomassa antes da secagem (g) e m_f é a massa da biomassa após a secagem (g).

5.3.3 Determinação das cinzas

Para determinar o teor de cinzas, cadinhos de porcelana foram previamente calcinados em forno mufla a 525 ± 25°C por cerca de 4 h. Amostras da biomassa in natura foram então colocadas nesses cadinhos previamente calcinados e submetidas a uma rampa de aquecimento no forno mufla, conforme descrito na norma NREL/TP-510-42622 (SLUITER *et al*., 2008c). As análises foram realizadas em triplicata, e o percentual de cinzas (C) foi calculado conforme a Equação (4),

$$C(\%) = \frac{m_3 - m_1}{m_2} \times 100 \qquad (4)$$

em que m_1, m_2 e m_3 representam a massa do cadinho vazio, a massa seca da amostra e a massa do cadinho com as cinzas, respectivamente.

5.3.4 Determinação dos extrativos

Para determinar o teor de extrativos, cartuchos de extração foram preenchidos com aproximadamente 5 g de biomassa e submetidos a um processo de extração utilizando água destilada e etanol 95% (vol/vol) em um aparelho Soxhlet, seguindo as recomendações da norma NREL/TP-510-42619 (SLUITER *et al*., 2008a). Na primeira etapa de extração, foram adicionados 190 mL de água destilada em balões de 250 mL, juntamente com pérolas de vidro. Os balões foram aquecidos utilizando mantas aquecedoras (Fisaton, modelo 52-6), com o aquecimento ajustado para proporcionar 4 ciclos de solvente por hora. Após a extração com água, as amostras foram secas com circulação de ar a 40°C e submetidas a uma nova extração utilizando etanol 95%. Ambas as extrações foram realizadas até que a coloração do solvente coletado no tubo do extrator Soxhlet desaparecesse completamente, o que levou 10 h para a água e 16 h para o etanol 95%. Ao final de cada etapa de extração, os solventes foram recuperados utilizando um evaporador rotativo (IKA, modelo RV10 digital), e o teor de extrativos (E) foi determinado por gravimetria. A Equação (4) detalha o cálculo realizado,

$$E(\%) = \frac{m_{bf} - m_{bi}}{m_{bs}} \times 100 \qquad (4)$$

onde m_{bf} é a massa do balão contendo os extratos, m_{bi} é a massa do balão seco e m_{bs} é a massa seca da amostra de biomassa utilizada no ensaio.

5.3.5 Determinação de carboidratos e lignina

A composição química da biomassa foi determinada por meio da hidrólise ácida do material, seguindo a norma NREL/TP-510-42618 descrita por Sluiter *et al*. (2008d). Inicialmente, 0,30 g de biomassa moída e livre de extrativos foram pesados em um tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 3,0 mL de ácido sulfúrico a 72% (m/m). Os tubos de ensaio foram então colocados em um banho-maria a 30°C por 1 h, sendo as amostras maceradas a cada 5 min com um bastão de vidro. Após 1 h, as amostras foram transferidas quantitativamente para frascos Schott com a adição de 84 mL de água deionizada. A hidrólise do material foi finalizada em autoclave por 1 h a 121°C e 1,1 bar. Os hidrolisados foram filtrados a vácuo em cadinhos de Gooch de porosidade média utilizando papel filtro de fibra de vidro. A fração líquida resultante da filtração foi transferida e avolumada em balão volumétrico de 250 mL e reservada para a quantificação de carboidratos e lignina solúvel em ácido. Os sólidos retidos nos cadinhos foram abundantemente lavados com água destilada e secos em estufa a 105 ± 5°C até atingirem massa constante. O teor de lignina insolúvel em ácido (LIA) foi então determinado de acordo com a Equação (5),

$$LIA(\%) = \frac{m_{LIA} - m_c}{m_a} \times 100 \qquad (5)$$

em que m_{LIA} representa a massa da lignina insolúvel em ácido, m_c refere-se à massa das cinzas presentes na lignina insolúvel em ácido, e m_a é a massa inicial da amostra. Para determinar a quantidade de cinzas na lignina, as amostras foram colocadas em cadinhos de porcelana previamente calcinados. As amostras foram inicialmente transferidas para o cadinho de porcelana e pesadas, em seguida, foram submetidas à calcinação em forno mufla, conforme descrito no item 4.3.3.

A quantificação da lignina solúvel em ácido (LSA) foi realizada utilizando um espectrofotômetro UV-visível (Global Analyzer). Alíquotas do hidrolisado foram diluídas e colocadas em cubetas de quartzo. A leitura dessas soluções foi feita a um

comprimento de onda de 240 nm, e a quantificação foi realizada conforme a Equação 6,

$$LSA(\%) = \frac{A \cdot V \cdot D}{m_a \cdot CP \cdot \varepsilon} \times 100 \quad (6)$$

onde A é a absorbância a 240 nm, Ɛ representa a absortividade da lignina de biomassa de cana-de-açúcar nesse comprimento de onda (25 L· (g · cm)$^{-1}$), V é o volume total do filtrado, D é a diluição, m_a é a massa seca inicial da amostra e CP é o comprimento de caminho da cubeta (1 cm).

A quantificação dos carboidratos e dos produtos de desidratação foi realizada utilizando técnicas de HPLC. As amostras e padrões foram injetados em um sistema cromatográfico (Shimadzu, modelo LC20AD) equipado com um amostrador manual, desgaseificador de fase móvel (modelo DGU 14A), forno de aquecimento de coluna (modelo CTO 10A) e detector de índice de refração (modelo RID10A). A coluna utilizada foi uma Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300 x 7,8 mm), precedida por uma pré-coluna Phenomenex Carbo-H (8,0 x 3,2 mm) e eluída a 65°C com ácido sulfúrico 10 mmol · L^{-1}a uma vazão de 0,6 mL· min^{-1}. A quantificação das amostras foi realizada por padronização externa com base em uma curva de calibração preparada para os seguintes componentes nas faixas de concentração: celobiose (0,05 a 0,5 mg · mL^{-1}), glucose (0,2 a 2,3 mg · mL^{-1}), arabinose (0,05 a 0,5 mg · mL^{-1}), xilose (0,15 a 1,5 mg · mL^{-1}) e ácido acético (0,15 a 1,5 mg · mL^{-1}).

Para a determinação de compostos furânicos empregou-se um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, com detecção por ultravioleta modelo SPD-10A ajustado em 280 nm, a separação realizada em coluna Kinetex C18 (150 x 4,6 mm) tendo como fase móvel metanol a 20% em um fluxo de 0,5 mL· min^{-1}. A curva de calibração para o HMF foi feita na faixa de 3,1 a 24 µg · mL^{-1} e furfural na faixa de 2,7 a 21 µg · mL^{-1}.

5.4 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A explosão a vapor foi conduzida sob condições reacionais previamente otimizadas por Pitarelo *et al*. (2016). Antes dos ensaios, foram realizadas explosões apenas com injeção de vapor (sem amostras) para condicionar o sistema. Os ensaios ocorreram a 195°C por 7,5 min (fator de severidade de 3,76) em um reator de aço

inoxidável com capacidade de 10 L, equipado com sensores para controle de temperatura e pressão (**Figura 12**). O reator estava conectado a uma caldeira de alta pressão, um compressor de ar e um ciclone, utilizado para a descarga do material. A alimentação do reator foi feita manualmente com aproximadamente 1 kg de biomassa contendo 50% de umidade, o que melhora a transferência de calor e massa durante o pré-tratamento, garantindo uma distribuição térmica mais uniforme e evitando superaquecimento localizado, além de favorecer a conversão dos polissacarídeos sem degradação excessiva. Após o carregamento do reator, a válvula de entrada de vapor foi aberta e o tempo de pré-tratamento foi cronometrado a partir do momento em que a temperatura desejada foi atingida. Ao final do tempo de pré-tratamento, a entrada de vapor foi fechada e a válvula inferior foi aberta para permitir a descompressão do material. O material foi então transportado para o interior de um ciclone e armazenado em um recipiente coletor. Para cada batelada, duas explosões foram realizadas apenas com injeção de vapor antes de retirar o material do recipiente coletor, com o objetivo de garantir a recuperação do material residual.

Figura 12 - Instalações do reator de explosão a vapor no NPDEAS (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável) da Universidade Federal do Paraná.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Após a despressurização, as amostras foram coletadas e submetidas a etapas de lavagem e centrifugação. Foram realizadas três lavagens à temperatura ambiente com um teor de sólidos totais de 2% ($m \cdot V^{-1}$) por 1 h, utilizando agitação mecânica. Alíquotas da fração líquida de todas as lavagens foram armazenadas para análise cromatográfica e quantificação de sólidos dissolvidos, conforme a norma NREL/TP-510-42621 (SLUITER *et al.*, 2008b). A fração sólida recuperada na última centrifugação foi armazenada sob vácuo e refrigeração para posterior análise composicional e hidrólise enzimática. O rendimento mássico (Rm) foi calculado com base na relação entre as massas recuperadas das frações sólida e líquida, conforme descrito na Equação (7),

$$R_m = \frac{m_S + m_L}{m_I} \times 100 \qquad (7)$$

em que m_S é massa da fração sólida, m_L massa da fração líquida e m_I massa inicial da biomassa.

Após a etapa de pré-tratamento, a explosão a vapor gera hidrolisados com uma quantidade significativa de oligômeros, que podem ser identificados na análise cromatográfica com tempos de retenção entre 6,0 e 7,5 min, o que evidencia a ocorrência de uma hidrólise parcial das hemiceluloses durante o pré-tratamento (RAMOS 2003; ALVIRA *et al.*, 2010). Assim, para quantificar esses oligômeros, uma hidrólise química é necessária, sendo então possível calcular a diferença entre os açúcares monoméricos presentes antes e após o tratamento de pós-hidrólise. O termo "pós-hidrólise" refere-se a uma etapa adicional de hidrólise aplicada depois de um processo inicial (neste caso, o pré-tratamento) com o objetivo de converter compostos maiores (oligossacarídeos) em compostos menores (monossacarídeos). Esse cálculo envolve subtrair a quantidade de monossacarídeos livres presentes inicialmente (antes da hidrólise) da quantidade total após o processo, permitindo, por meio de uma análise reversa, determinar a quantidade de oligossacarídeos originalmente presentes na amostra.

A quantificação de oligossacarídeos depois do processo de pós-hidrólise pode ser feita por meio de cálculo utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Inicialmente, as amostras de biomassa são submetidas a um pré-tratamento, como explosão a vapor, e as frações solúveis são analisadas por HPLC para identificar oligossacarídeos e monossacarídeos. Após essa análise inicial, a

amostra passa por uma pós-hidrólise ácida, que converte os oligossacarídeos em monossacarídeos. A amostra é novamente analisada por HPLC para gerar um novo perfil cromatográfico, onde os picos de oligossacarídeos diminuem ou desaparecem, enquanto os picos de monossacarídeos aumentam.

A diferença entre a quantidade de monossacarídeos antes e após a hidrólise reflete a quantidade de oligossacarídeos que estavam presentes inicialmente na amostra. Esse método é eficiente para estimar a concentração de oligossacarídeos presentes nas frações solúveis da biomassa, permitindo uma análise com base na comparação dos picos cromatográficos.

5.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS

Para a quantificação dos carboidratos presentes na fração solúvel, majoritariamente derivados das hemiceluloses, foi realizada uma reação de pós-hidrólise conforme a norma NREL/TP-510-42623 (SLUITER *et al*., 2008e). A pós-hidrólise converte oligossacarídeos em monossacarídeos, permitindo sua quantificação por padronização externa utilizando curvas de calibração para compostos como celobiose, glucose, xilose e arabinose. Além dos monossacarídeos, também foram monitorados os produtos de desidratação, incluindo HMF, furfural, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico.

A caracterização da fração insolúvel foi realizada conforme descrito na seção 5.3.5. Esse procedimento permitiu a quantificação da recuperação dos principais constituintes presentes no material tratado em relação ao material original, essencial para a realização do balanço mássico após a explosão a vapor.

5.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A acessibilidade dos substratos pré-tratados foi avaliada com base em estudos realizados pelo grupo de pesquisa. Os ensaios foram realizados a 15% ($m \cdot V^{-1}$) de sólidos insolúveis em água utilizando 60 mg de enzima Cellic CTec3 e 6 mg de Cellic HTec por grama de material seco. Foram preparadas quatro amostras em triplicata a partir da fração fibrosa (C6) da biomassa de cana-energia Vertix 11 lavada. Em todas as amostras foi utilizada a enzima Cellic CTec3 (celulase),

enquanto a adição da fração líquida hemicelulósica (C5) e da enzima Cellic HTec3 (hemicelulase) variou conforme descrito na Tabela 4. As amostras que continham apenas a fração C6 foram preparadas em tampão acetato de sódio 50 mmol·L^{-1}, com pH ajustado para 5,2. Já as amostras contendo a fração C5 tiveram o pH corrigido para 5,2 utilizando pérolas de NaOH, a fim de manter as condições ótimas para a atividade enzimática. A Tabela 4 apresenta a configuração detalhada das combinações de frações e enzimas utilizadas no processo de hidrólise enzimática.

Tabela 4 – Configuração das amostras submetidas a etapa de hidrólise enzimática.

Amostra	Frações da biomassa	Enzima Cellic CTec3	Enzima Cellic HTec3
$C_{CTec/HTec}^{6/5}$	Fibrosa (C6) + líquida hemicelulósica (C5)	Sim	Sim
$C_{CTec/HTec}^{6}$	Fibrosa (C6)	Sim	Sim
C_{CTec}^{6}	Fibrosa (C6)	Sim	Não
$C_{CTec}^{6/5}$	Fibrosa (C6) + líquida hemicelulósica (C5)	Sim	Não

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

As reações ocorreram em uma incubadora de agitação orbital (Infors, modelo Ecotron) por 96 h a 50°C e 110 rpm. Para monitorar a liberação de carboidratos hidrossolúveis no hidrolisado, alíquotas foram coletadas nos tempos de 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 h, sendo fervidas por 5min e centrifugadas a 8000 rpm, diluídas e analisadas utilizando o sistema cromatográfico mencionado na seção 5.3.5. Os componentes monitorados por padronização externa incluíram celobiose, glucose e xilose. Esses valores foram expressos em relação aos polissacarídeos de origem, e os rendimentos de hidrólise foram calculados em relação à celulose presente na biomassa pré-tratada (Equação 8).

$$GlcEq(\%) = \frac{(C_{cel} \cdot 1{,}0526 + C_{Glc}) \cdot 0{,}9}{AnGlc_i} \times 100 \qquad (8)$$

onde C_{cel} representa a concentração de celobiose, C_{Glc} é a concentração de glucose e $AnGlc_i$ é o teor de glucanas determinado no material.

5.7 FERMENTAÇÃO

5.7.1 Preparação do meio de cultura

O meio de cultura utilizado para o crescimento da levedura Celere-2L foi preparado conforme as instruções do fornecedor. O meio empregado foi o YPD, que consiste em 10 g· L^{-1}, de extrato de levedura, 20 g· L^{-1}, de peptona e 20 g· L^{-1}, de glucose, e foi esterilizado em autoclave por 15 min a 121°C e 1,1 bar. Após a esterilização, o meio de cultura foi resfriado e transferido para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, ao qual a levedura foi adicionada. Em seguida, o frasco foi vedado com tampão de algodão e submetido à agitação em uma incubadora orbital (Infors, modelo Ecotron) por 24 h a 32°C e 90 rpm para a multiplicação da levedura. Todas as manipulações do material utilizado nos ensaios foram realizadas próximo a uma lamparina para evitar contaminações.

5.7.2 Ensaios de fermentação

Para a fermentação, foram utilizados hidrolisados obtidos após a sacarificação na incubadora de agitação orbital, conforme descrito na seção 5.6. A fermentação foi realizada em reator (Infors, modelo Multifors), de capacidade total de 500 mL, sendo empregado nos experimentos aproximadamente 250 mL. A fermentação ocorreu em uma temperatura de 32°C e 100 rpm por 24 h. Todos os ensaios foram realizados simultaneamente com a fermentação de uma solução controle de glucose de concentração equivalente ao hidrolisado a ser fermentado. Vale destacar que todos os materiais utilizados nesta etapa foram previamente esterilizados em autoclave. O rendimento das fermentações foi calculado conforme a Equação (9),

$$E_f(\%) = \frac{[EtOH_f]}{[Glc_i] \cdot 0{,}51} \times 100 \qquad (9)$$

onde $\mathrm{E_f}$ (%) é a eficiência de fermentação, $[\mathrm{Glc_i}]$ é a concentração de glucose inicial,

[$EtOH_f$] é a concentração de etanol final. A quantificação foi realizada no sistema cromatográfico descrito no item 4.3.4, onde foram monitorados os seguintes componentes: glucose (0,2 a 2,3 mg· mL^{-1}), etanol (0,3 a 3 mg· mL^{-1}), ácido acético (0,15 a 1, mg· mL^{-1}), ácido fórmico (0,05 a 1,5 mg· mL^{-1}).

5.7.3 Remoção de inibidores

O líquido hemicelulósico das biomassas Vertix 11 obtido no pré-tratamento de explosão a vapor foi submetido ao processo de destilação sob pressão reduzida, com intuito de remover possíveis inibidores voláteis, a exemplo de furânicos e ácidos orgânicos. A destilação realizada em rota-evaporador modelo IKA, modelo RV10 digital, a uma rotação de balão de 60 rpm e temperatura de 75 °C, sob pressão reduzida por meio de uma bomba de vácuo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 LAVAGEM AQUOSA DA BIOMASSA DE CANA ENERGIA

Antes de iniciar as etapas de caracterização química e pré-tratamento, uma triplicata de amostras de biomassa de cana energia passaram por uma etapa de lavagem aquosa a 2% ($m \cdot V^{-1}$) de sólidos insolúveis em água (WIS, *water-insoluble solids*) para remover a quantidade residual de açúcares (glucose, frutose e sacarose) resultante da extração do caldo.

As lavagens foram realizadas a 2% ($m \cdot v^{-1}$) WIS para facilitar o processo de agitação da hélice no momento da lavagem. No total, foram encontrados 1,17% de açúcares residuais em três lavagens aquosas realizadas em triplicata, compostos exclusivamente por glucose e frutose (0,59 e 0,58%, respectivamente). A ausência total de sacarose no extrato aquoso pode ser atribuída a sua hidrólise durante o processo de extração. Embora a hidrólise da sacarose (α-D-glucopiranosil-β-D-frutofuranosídeo) nesse meio seja muito mais lenta do que em condições ideais de temperatura e pH, a labilidade de sua ligação glicosídica justificaria a sua ausência no extrato aquoso da biomassa de cana energia.

O restante da biomassa de cana energia não passou pelo processo de lavagem aquosa antes do pré-tratamento, conforme ilustrado na **Figura 11** e descrito na seção 5.3.1.

6.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A compreensão da composição química da biomassa lignocelulósica é essencial para determinar suas propriedades e adequação a processos de conversão como a produção de etanol celulósico. A análise composicional das amostras de Vertix 11, antes e após a etapa de lavagem aquosa, foi realizada e comparada aos dados obtidos por Maia (2023) para o seu material de referência (cana-de-açúcar convencional da variedade RB92579) e, também, para a biomassa de cana energia da variedade Vertix 11. Maia (2023) foi usada como referência por fazer parte dos trabalhos do grupo de estudos e seguir a mesma linha de pesquisa abordada neste presente trabalho. Os valores médios obtidos nessa análise estão apresentados na **Tabela 5**.

O teor de cinzas e extrativos foi obtido a partir de amostras da biomassa *in natura*, enquanto os percentuais de carboidratos e lignina foram quantificados a partir

do material livre de extrativos. A remoção de extrativos elimina materiais não estruturais que podem interferir na análise quantitativa dos demais componentes (SLUITER *et al*., 2008d). Todos os resultados foram calculados em base seca e são provenientes de experimentos realizados em triplicata. Nota-se que o somatório correspondente varia entre 98 e 99%, aproximadamente. Isso ocorre devido a não quantificação de alguns compostos presentes na matéria-prima, como ácidos urônicos e proteínas. Além disso, é necessário considerar possíveis imprecisões na determinação de parâmetros como o teor de umidade. A lavagem aquosa do material resultou em uma redução de 54,5% no teor de extraíveis em água, de 5,5 para 2,5**%** (**Tabela 5**). No entanto, em 5,5% de extraíveis em meio aquoso, foram quantificados apenas 1,5% de açúcares residuais (item 6.1). Portanto, a amostra contém outros componentes hidrossolúveis, além de sacarose, glucose e frutose, mas essa diferença também pode ter decorrido de algum erro experimental.

Tabela 5 - Composição química da biomassa de cana energia e do bagaço cana-de-açúcar convencional antes da explosão a vapor.

Percentual (%)				
			Vertix 11	
Componentes	RB92579[1]	Vertix 11[2]	Não lavado	Lavado
Glucanas	38,5 ± 0,3	40,2 ± 0,1	41,2 ± 0,1	39,7 ± 0,1
Xilanas	18,0 ± 0,2	17,7 ± 0,7	20,2 ± 0,2	18,6 ± 0,2
Anidroarabinose em xilanas	1,3 ± 0,3	1,9 ± 0,2	2,7 ± 0,2	3,2 ± 0,2
Grupo acetila	2,9 ± 0,9	2,6 ± 0,4	2,5 ± 0,3	2,3 ± 0,2
Lignina insolúvel em ácido	16,0 ± 0,6	20,4 ± 1,0	20,6 ± 0,1	23,5 ± 0,1
Lignina solúvel em ácido	4,8 ± 0,7	5,7 ± 0,7	1,5 ± 0,3	1,9 ± 0,2
Extraíveis totais	8,1 ± 0,4	5,2 ± 0,5	9,0 ± 0,1	8,8 ± 0,1
Água	5,5 ± 0,5	2,6 ± 0,5	5,5 ± 0,3	2,5 ± 0,1
Etanol	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,1	3,6 ± 0,2	6,2 ± 0,5
Cinzas	3,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,2
Total	**93,3**	**95,1**	**98,7**	**98,8**

[1]Composição química do bagaço de cana-de-açúcar convencional obtida por (MAIA, 2023).
[2]Composição química da biomassa de cana energia da variedade Vertix 11 obtida por (MAIA, 2023).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

A escolha de expressar os resultados em glucanas, xilanas e grupo acetila, em vez de glucose, xilose e ácido acético, deve-se à necessidade de representar a composição estrutural original da biomassa lignocelulósica. Glucanas e xilanas são

polímeros que compõem a celulose e a hemicelulose, respectivamente, e sua quantificação reflete a quantidade real desses polissacarídeos na biomassa antes da degradação. Caso os resultados fossem expressos em glucose e xilose, por exemplo, isso indicaria apenas os açúcares livres presentes após hidrólise, não permitindo uma avaliação precisa da estrutura original da biomassa. Assim, a nomenclatura utilizada permite uma interpretação mais fiel da composição da matéria-prima antes dos processos de conversão.

Ao comparar a biomassa lavada com água de Vertix 11 com a da amostra controle de cana-de-açúcar (variedade RB92579) analisada por Maia (2023), observa-se que o teor de glucanas não variou significativamente, com percentuais registrados de 39,7 e 38,5%, respectivamente. Já para o material não lavado, o teor de glucanas foi ligeiramente superior (41,2%). As amostras de Vertix 11, lavada ou não lavada com água, apresentaram teores de lignina insolúvel em ácido superiores ao relatado para a variedade RB92579 (23,5%, 20,6 e 16,5%, respectivamente), sugerindo que colmos de cana energia, para suportar o seu maior porte estrutural, desenvolveram paredes celulares vegetais mais lignificadas. Os teores de hemiceluloses, representados pela soma de anidroxilose e anidroarabinose, também foram ligeiramente maiores para as biomassas de cana energia e isso pode estar associado ao seu maior teor de lignina, já que esta apresenta ligações covalentes com hemiceluloses de função estrutural. Vale ressaltar que o teor de arabinoxilanas nas biomassas lavada e não lavada de Vertix 11 foi o mesmo, variando apenas a razão molar entre xilose e arabinose, e isto pode estar associado a problemas de resolução cromatográfica, já que esses monossacarídeos apresentam tempos de retenção bastante próximos na análise por HPLC utilizando resinas catiônicas fortemente ácidas como fase móvel. Finalmente, menores teores de lignina solúvel em água também podem ser atribuídos ao maior estágio de lignificação da Vertix 11, enquanto diferenças no teor de cinzas devem ter sido fruto de variações no preparo da amostra ou em seus parâmetros agronômicos, como condições de cultivo e sazonalidade.

A composição química da variedade de cana energia foi então comparada com a obtida por Maia (2023), que utilizou o mesmo material genético (Vertix 11), oriundo da mesma estação experimental. Os teores de glucanas (majoritariamente celulose), hemiceluloses (majoritariamente xilanas parcialmente acetiladas e substituídas por

resíduos de arabinose), lignina total (solúvel e insolúvel em ácido) e outros componentes minoritários (extrativos e cinzas) foram de 40,2%, 17,7%, 26,1% e 6,6%, respectivamente (MAIA, 2023). A **Tabela 5** apresenta pequenas diferenças em praticamente todos esses componentes, independentemente da biomassa de Vertix 11 ter sido submetida à lavagem aquosa ou não. Szczerbowski *et al*. (2014) sugeriram que as variações nos dados de análise composicional da biomassa podem ser explicadas pela forma de apresentação dos valores ou pelos métodos experimentais utilizados. Fatores como a extensão da remoção de extrativos, a quantificação adequada de componentes minoritários, o comprimento de onda usado para determinar lignina solúvel em ácido, a resolução da coluna cromatográfica empregada e a aplicação de fatores de hidrólise para contabilizar perdas devidas à desidratação de açúcares podem influenciar os resultados obtidos. Além disso, as diferenças observadas podem ter sido oriundas de variações nas condições de cultivo, do estágio de maturidade da planta no momento da colheita e em erros experimentais associados aos procedimentos analíticos envolvidos na determinação da composição química de materiais lignocelulósicos.

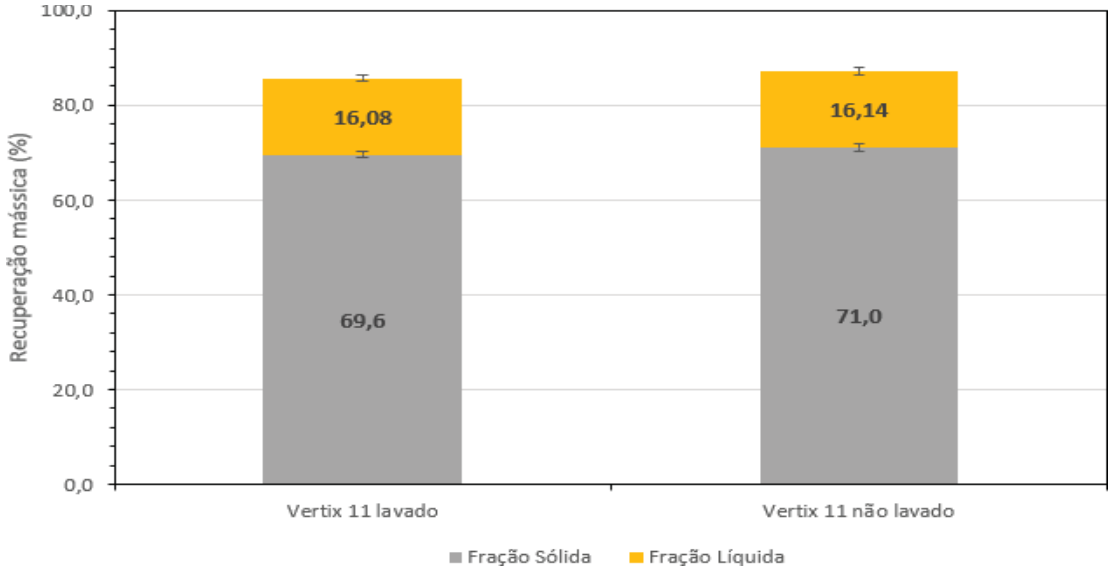
6.3 EXPLOSÃO A VAPOR

A explosão a vapor foi conduzida em condições operacionais previamente otimizadas para maximizar a recuperação de glucanas na fibra e de hemiceluloses na fração líquida, conforme descrito por Pitarelo *et al*. (2016). O pré-tratamento foi realizado em condições de auto-hidrólise, sem a adição de catalisadores exógenos. A **Figura 13** apresenta os valores médios (triplicatas) das recuperações mássicas obtidas após o pré-tratamento de amostras de Vertix 11 lavadas e não lavadas com água. A comparação entre amostras lavadas e não lavadas antes da explosão a vapor teve por objetivo verificar se esse procedimento alteraria significativamente as etapas subsequentes do processo. A não lavagem pode impactar tanto a eficiência do pré-tratamento quanto as etapas de hidrólise enzimática e de fermentação devido à geração de inibidores no meio de reação. Portanto, a inexistência de mudanças significativas entre o comportamento das amostras poderá demonstrar que a etapa de lavagem aquosa antes do pré-tratamento é desnecessária.

As duas amostras de Vertix 11 atingiram um rendimento de recuperação

global de aproximadamente 87,0% nos experimentos de explosão a vapor, em relação à massa seca da biomassa. As amostras lavadas apresentaram uma recuperação de 69,6% para a fração sólida e 16,1% para a fração líquida. De forma semelhante, as amostras não lavadas mostraram uma recuperação de 71,0% para a fração sólida, mantendo os mesmos 16,1% para a fração líquida. Observa-se também que houve perda na recuperação mássica de aproximadamente 14,0% para as duas amostras. Essa diferença está atribuída principalmente à volatilização de compostos durante o pré-tratamento e a limitações inerentes ao desenho do reator, que pode ter acarretado perdas físicas de processo (SZCZERBOWSKI *et al*., 2014; BHATIA *et al*., 2020). Durante a explosão a vapor, alguns componentes da biomassa, como ácidos orgânicos e compostos fenólicos, podem ser volatilizados a altas temperatura e pressão. Além disso, componentes hemicelulósicos, que são mais termossensíveis, são parcialmente desidratados a furfural e hidroximetilfurfural (HMF), que também podem ser perdidos por volatilização. Esses fatores, somados à eficiência do reator, contribuem para a perda observada na recuperação total da biomassa após o pré- tratamento. Pitarelo *et al*. (2016) obtiveram, em ensaios de auto-hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, uma recuperação de 18,0% de fração líquida e 79,3% de fração sólida. Maia (2023), realizando ensaios de auto-hidrólise de biomassas das mesmas variedades de cana-de-açúcar (RB92579) e de cana energia (Vertix 11) utilizadas neste estudo, observou valores médios de recuperação de 63,8 e 68,4% de fração sólida e de 24,6 e 17,3% de fração líquida, respectivamente.

Figura 13 - Recuperação mássica das amostras após pré-tratamento por explosão a vapor.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

6.3.1 Composição química das frações sólida e líquida após a explosão a vapor

As frações sólidas obtidas após explosão a vapor foram caracterizadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.5 e os resultados estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Composição química da fração sólida da biomassa de cana energia e do bagaço de cana-de-açúcar convencional após explosão a vapor.

	Percentual (%)			
			Vertix 11	
Componentes	RB92579[1]	Vertix 11[2]	Não lavado	Lavado
Glucanas	62,2 ± 1,3	61,7 ± 1,3	61,9 ± 0,7	62,5 ± 0,5
Xilanas	4,0 ± 0,4	2,8 ± 0,1	5,2 ± 0,2	3,0 ± 0,6
Grupo acetila	1,0 ± 0,1	ald[3]	ald[3]	ald[3]
Pentoses desidratadas	0,4 ± 0,1	ald[3]	ald[3]	ald[3]
Lignina total	27,8 ± 1,5	32,9 ± 1,2	31,5 ± 0,9	33,8 ± 0,6
Solúvel em ácido	3,9 ± 0,7	2,3 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,4 ± 0,5
Insolúvel em ácido	23,9 ± 0,7	30,6 ± 0,7	29,7 ± 0,7	34,6 ± 0,5
Cinzas	2,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5±0,2
Total	**97,5**	**98,0**	**99,2**	**99,8**

[1]Composição química do bagaço de cana-de-açúcar convencional obtido por (MAIA, 2023)
[2]Composição química da biomassa de cana energia da variedade Vertix 11 obtida por (MAIA,2023).
[3]Abaixo do nível de detecção.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

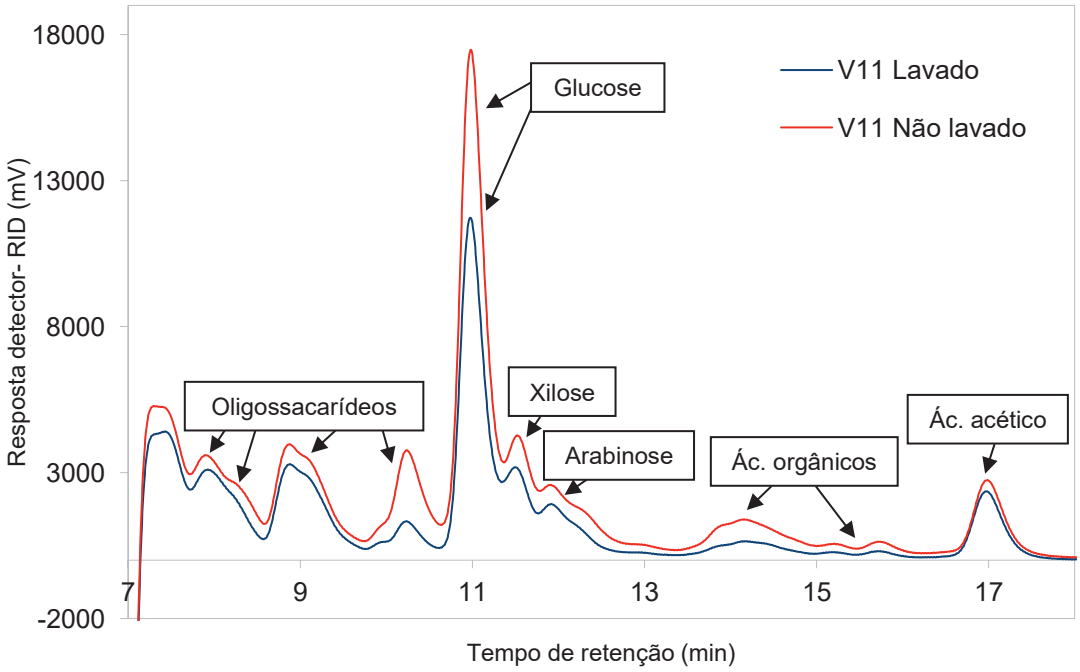
A análise química das amostras revelou um aumento nos níveis de glucanas e lignina em comparação ao material original (**Tabela 5**). Esse acréscimo é atribuído principalmente à hidrólise das hemiceluloses durante o pré-tratamento. Adicionalmente, a **Tabela 6** evidencia a presença de compostos furânicos como o furfural nos hidrolisados ácidos das amostras RB92579 e Vertix 11. Esse composto é formado pela desidratação de pentoses, embora sua origem exata seja incerta, dado que a desidratação pode derivar tanto da xilose quanto da arabinose, os principais açúcares presentes nas hemiceluloses (BAZOTI *et al*., 2017; HUANG *et al*., 2011).

A composição química das frações líquidas resultantes do pré-tratamento foi determinada por cromatografia a líquido de alta eficiência para monitorar as

recuperações de carboidratos, compostos furânicos e ácidos orgânicos (**Figura 14**). No entanto, carboidratos e ácidos orgânicos foram detectados por refratometria diferencial após análise por cromatografia de troca iônica, enquanto compostos furânicos foram analisados por cromatografia de fase reversa e monitorados por espectrometria no ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm.

A **Figura 14** mostra que a explosão a vapor gerou hidrolisados com uma quantidade significativa de oligossacarídeos, com tempos de retenção entre 7,0 e 8,0 min. Isso confirma a ocorrência de uma hidrólise parcial das hemiceluloses durante o pré-tratamento, conforme relatado por outros autores (RAMOS 2003; ALVIRA *et al*., 2010).

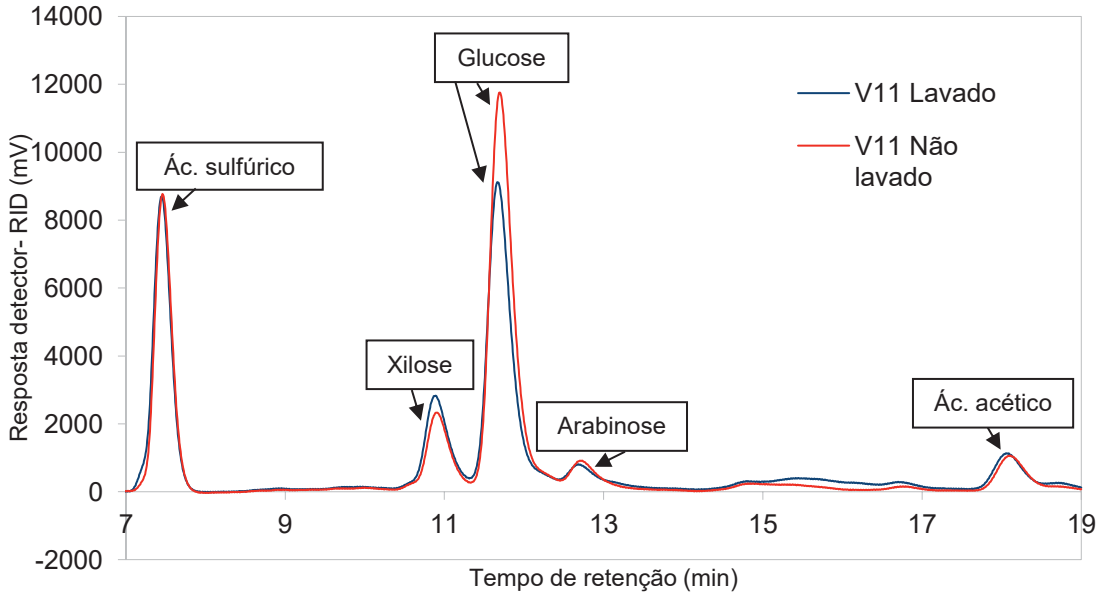
Figura 14 - Perfil cromatográfico de carboidratos (hidrólise parcial) e ácidos orgânicos das frações solúveis em água obtidas após pré-tratamento por explosão a vapor de amostras de cana energia.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Conforme mencionado na sessão 5.4, foi possível quantificar os oligômeros convertidos em monossacarídeos. Para isso, os licores de pré-tratamento (frações C5) das primeiras e segundas lavagens das fibras pré-tratadas passaram por uma etapa de pós-hidrólise utilizando ácido sulfúrico diluído, seguida de uma nova análise cromatográfica. A **Figura 15** apresenta a quantificação dos componentes obtidos após esse processo de pós-hidrólise.

Figura 15 - Perfil cromatográfico após análise por HPLC das frações solúveis obtidas após o pré-tratamento (auto-hidrólise), após procedimento de pós-hidrólise.

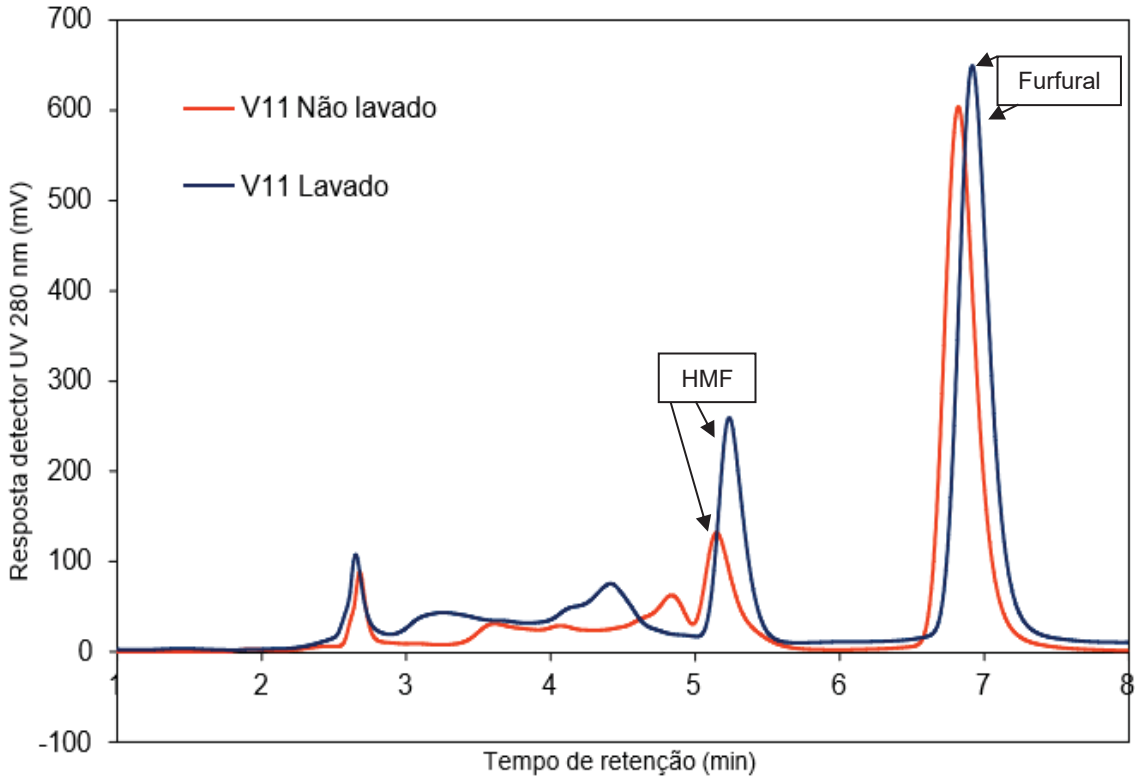


Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Observa-se que a hidrólise foi completa para as duas amostras, conforme evidenciado pela ausência de oligossacarídeos na faixa de tempos de retenção desde o componente não retido (ácido sulfúrico) até a banda de eluição da glucose. Houve um aumento significativo das concentrações de glucose, xilose e arabinose, com aumento da resolução entre eles devido à hidrólise de oligossacarídeos minoritários.

O uso de espectrometria no ultravioleta para análise do perfil cromatográfico de fase reversa das frações solúveis em água, obtidas após o pré-tratamento das amostras de cana energia, também revela informações importantes sobre a presença e a concentração de compostos furânicos, que são produtos típicos da degradação térmica de carboidratos. A **Figura 16** compara os perfis cromatográficos das amostras de Vertix 11 lavadas e não lavadas, evidenciando diferenças pouco significativas entre os dois tratamentos.

Figura 16 – Perfil cromatográfico de compostos furânicos das frações solúveis em água obtidas após pré-tratamento por explosão a vapor de amostras de cana energia.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Os tempos de retenção específicos para HMF e furfural (valores de t_R em torno de 5,5 e 7,0 min na **Figura 16**) demonstram a ocorrência de reações de desidratação de hexoses e pentoses, respectivamente, o que é esperado nesse tipo de sistema reacional. A amostra lavada com água (representada pela linha azul) apresentou concentrações de HMF superiores às observadas para as amostras não lavadas (linha vermelha), enquanto a presença de furfural foi equivalente em ambos os casos.

A resposta do detector UV a 280 nm confirma que há uma concentração elevada de compostos furânicos em ambas as amostras analisadas. A diferença nos tempos de retenção pode ser justificada pela injeção manual das amostras no HPLC, além da presença de componentes minoritários nas amostras que permanecem mais tempo na coluna e aparecem nas análises subsequentes.

A quantificação dos oligômeros, bem como de ácido acético, é mostrada na **Tabela 7**. Essa quantificação diz respeito a mudança do cromatograma representado na **Figura 14** para a **Figura 15**. No que diz respeito à glucose, as amostras não lavadas apresentaram concentrações um pouco superiores, tanto na

fração C5 (3,1 g·L^{-1}) quanto no material pós-hidrolisado (9,9 g·L^{-1}), em comparação com as amostras lavadas (1,9 e 8,9 g·L^{-1}, respectivamente). Esse resultado pode ser atribuído à presença de oligossacarídeos nas amostras não lavadas que, após a pós-hidrólise, liberaram quantidades maiores de glucose. A lavagem aquosa antes do pré-tratamento, por sua vez, removeu parte dos açúcares residuais, resultando em menores concentrações de glucose.

Tabela 7 – Concentração dos açúcares monoméricos presentes antes e após o tratamento de pós-hidrólise.

	Vertix 11 não lavado		Vertix 11 lavado	
Componentes	Fração C5	Pós-hidrólise	Fração C5	Pós-hidrólise
Glucose (g·L^{-1})	3,1 ± 0,4	9,9 ± 0,9	1,9 ± 0,1	8,9 ± 1,5
Xilose (g·L^{-1})	13,6 ± 2,0	33,0 ± 3,9	17,0 ± 0,6	34,0 ± 3,1
Ácido acético (g·L^{-1})	5,0 ± 0,3	8,6 ± 1,6	3,9 ± 0,2	7,9 ± 0,5

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Em relação à xilose, observa-se também uma diferença mínima entre as amostras lavadas e não lavadas na fração C5, com a amostra lavada apresentando uma concentração inicial de 17,0 g·L^{-1}, em comparação com 13,6 g·L^{-1} na amostra não lavada. No entanto, depois do processo de pós-hidrólise, ambas as amostras convergiram para concentrações elevadas de xilose, com valores de 33,0 e 34,0 g·L^{-1} para as amostras não lavada e lavada com água antes do pré-tratamento, respectivamente. Isso demonstra que a hidrólise dos oligossacarídeos foi eficiente, resultando em uma liberação significativa de xilose em ambas as condições. A proximidade dos valores após a hidrólise indica que, independentemente da lavagem, a conversão dos oligossacarídeos em xilose foi eficaz.

Quanto ao ácido acético, observa-se um aumento em ambas as amostras após a pós-hidrólise. Na amostra não lavada, a concentração de ácido acético passou de 5,0 para 8,6 g·L^{-1} (não lavada), enquanto na amostra lavada, o aumento foi de 3,9 para 7,95 g·L^{-1} (não lavada). O aumento já esperado na concentração de ácido acético está atribuído à hidrólise dos grupamentos acetila presentes nas hemiceluloses, que são convertidos a ácido acético, resultando na liberação de monossacarídeos e oligossacarídeos hidrossolúveis no licor do pré-tratamento.

Com base nos dados obtidos a partir da análise quantitativa dos produtos de pós-hidrólise, foi determinada a recuperação de massas do processo de pré-tratamento para os principais componentes da biomassa de cana energia. A **Tabela 8** apresenta esses resultados para as frações líquida e sólida, e os valores de recuperação de glucanas e xilanas estão nas **Figura 17 e 18**, respectivamente. Para todas as amostras, a recuperação de glucanas (**Figura 17**) ficou próxima a 100%, indicando que estas não sofreram hidrólise ácida de forma significativa e foram majoritariamente recuperadas na fração sólida. De forma similar, Pitarelo *et al*. (2016) e Maia (2023) relataram uma recuperação de glucanas próxima ou superior a 100% em amostras de cana-de-açúcar e de cana energia pré-tratadas sob as mesmas condições operacionais.

Tabela 8 - Recuperação mássica dos componentes presentes nas frações sólida e líquida após pré- tratamento a vapor.

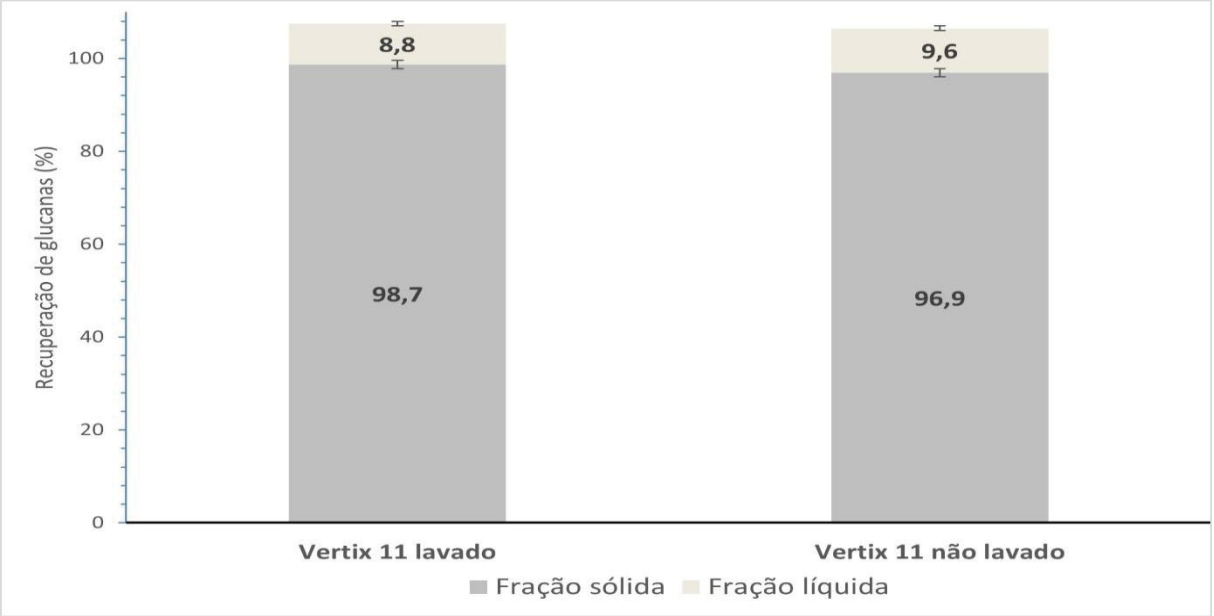
Componentes	Vertix 11	
	Material não lavado	Material lavado com água
Recuperação na fração sólida (%)		
Glucanas	96,9 ± 1,0	98,7 ± 0,8
Xilanas	13,2 ± 0,1	10,8 ± 0,1
Lignina	92,0 ± 1,0	91,8 ± 0,6
Recuperação na fração líquida (%)		
Glucanas	9,6 ± 0,9	8,8 ± 1,5
Xilanas	68,1 ±3,8	79,7 ± 3,1
Arabinose	29,8 ± 0,2	22,3 ± 0,2
Grupos acetila	98,6 ± 0,7	98,8 ± 0,5

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

No contexto da recuperação de xilanas, observa-se que estas se concentram principalmente na fração líquida como resultado das reações de hidrólise. As hemiceluloses, devido a sua maior labilidade frente a ácidos em comparação com as glucanas (predominantemente celulose), são transformadas em produtos solúveis em água. Essa suscetibilidade à hidrólise ácida pode ser atribuída ao baixo grau de polimerização das hemiceluloses que, por sua natureza amorfa, são facilmente

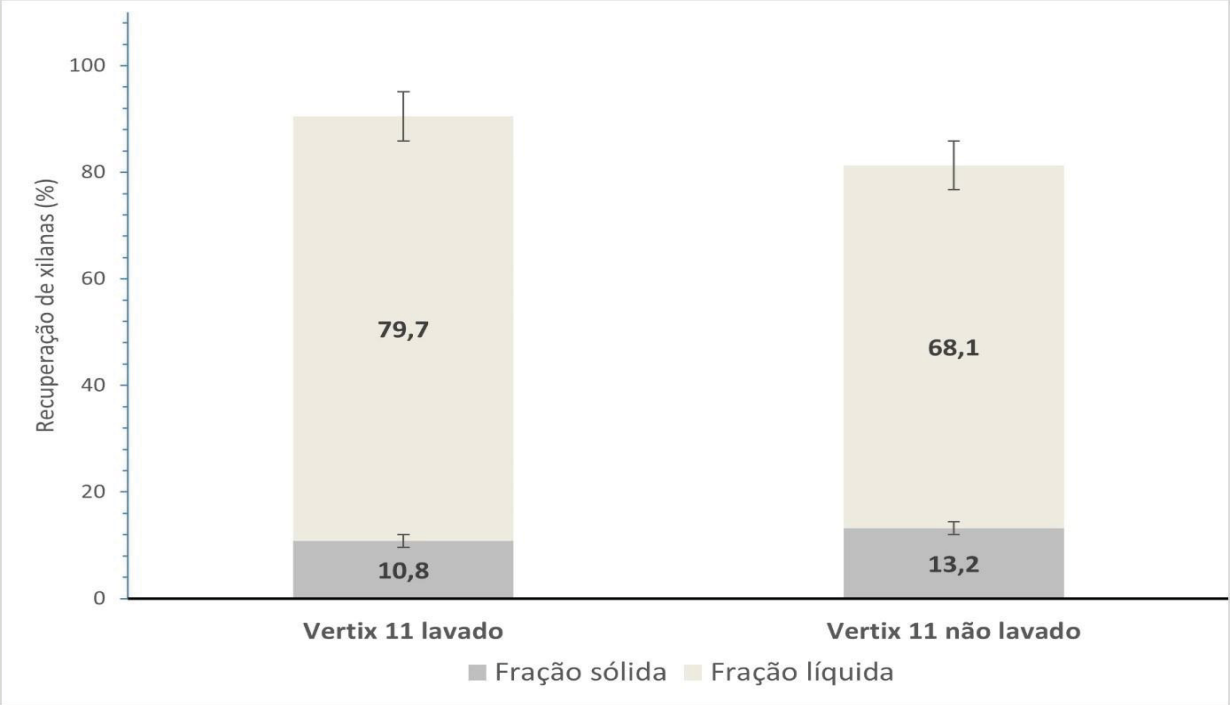
solvatadas, facilitando a protonação do oxigênio glicosídico, especialmente nas regiões de ramificação. Adicionalmente, as ligações β-(1,4) presentes nas xilanas demonstram uma maior vulnerabilidade à hidrólise ácida em comparação com aquelas da celulose.

Figura 17 - Recuperação de glucanas nas frações sólida e líquida para a explosão a vapor das biomassas de cana energia.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Figura 18 - Recuperação de xilanas nas frações sólida e líquida para a explosão a vapor das biomassas de cana energia.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

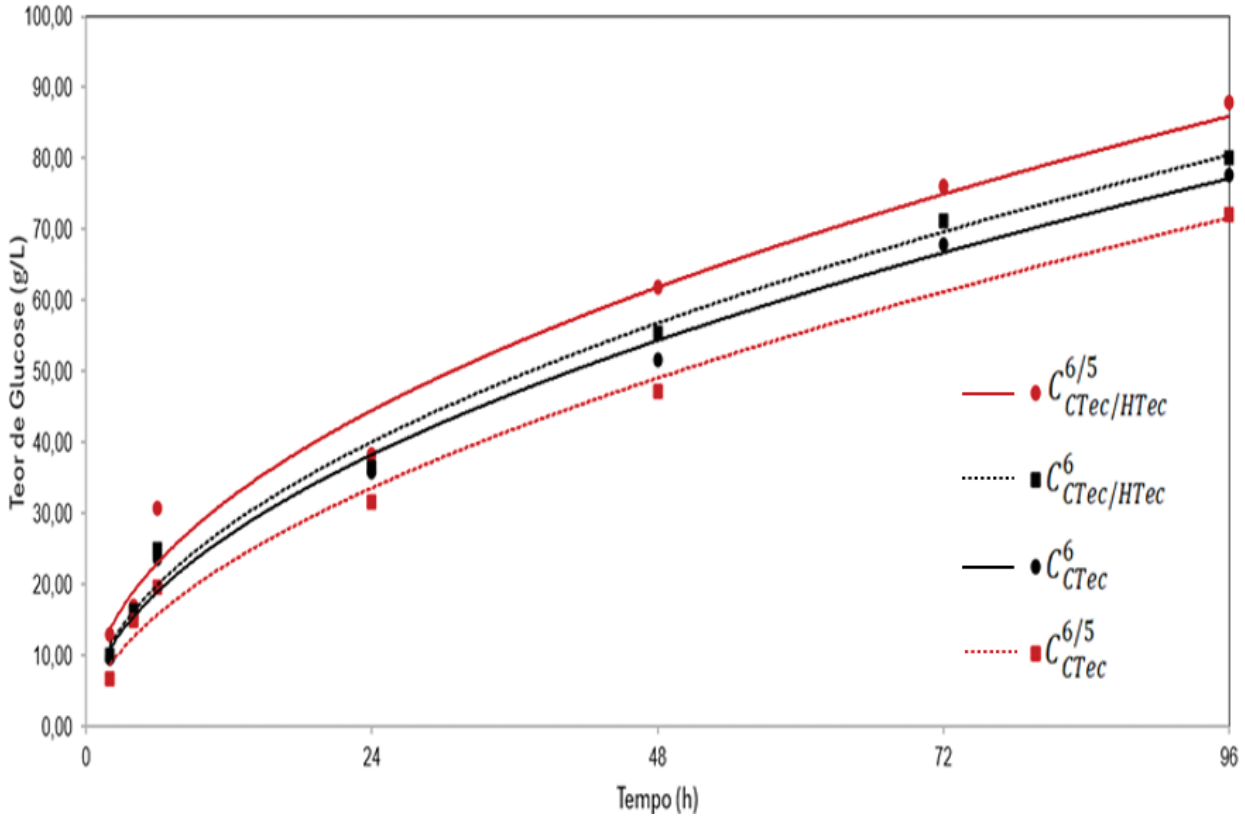
Conforme mostrado na **Figura 18**, a recuperação de xilanas nas amostras de Vertix 11 lavadas com água superou os valores obtidos a partir da amostra não lavada. A maior recuperação de xilanas nas amostras de Vertix 11 lavadas, antes da etapa de pré-tratamento, em comparação com as amostras não lavadas, pode ser explicada por fatores associados ao processo de pré-tratamento.

6.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As curvas da hidrólise enzimática a 15% ($m \cdot V^{-1}$) de sólidos insolúveis em água, apresentadas nas **Figuras 19, 20 e 21**, representam a concentração do teor de glucose, a concentração do teor de xilose e a soma total desses dois açúcares presentes no material analisado, respectivamente. As hidrólises foram realizadas até 96 h e, durante esse período, não houve redução na concentração de monossacarídeos, indicando que não ocorreu contaminação microbiana e que o sistema foi mantido em condições assépticas adequadas, mesmo sem a adição de inibidores de crescimento ao meio. Todas as amostras foram analisadas a partir da fração fibrosa da biomassa Vertix 11 (fração C6), com adição da enzima Cellic CTec3 (celulase) ao meio reacional, e comparadas às amostras contendo a fração líquida hemicelulósica (fração C5), na presença ou ausência da enzima Cellic HTec3 (hemicelulase), conforme **Tabela 4** deste trabalho.

Considerando os erros experimentais associados à hidrólise enzimática realizados a 15% ($m \cdot V^{-1}$) de sólidos insolúveis em água dos materiais pré-tratados, empregando 60 $mg \cdot g^{-1}$ de Cellic CTec3 e 6 $mg \cdot g^{-1}$ de Cellic HTec3, observa-se que houve muito pouca diferença entre os perfis de hidrólise, independentemente da adição da fração C5. Os perfis de hidrólise foram ajustados, apresentando suas respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2) para avaliação da qualidade do ajuste, conforme **Tabelas 9 e 10**. Os ajustes matemáticos nessas tabelas foram escolhidos por se adequarem melhor aos dados experimentais obtidos.

Figura 19 - Liberação de glucose a partir de hidrólise enzimática da biomassa de Vertix 11 explodida a vapor para experimentos realizados a 15% (m·V^{-1}) WIS com 60 mg de Cellic CTec3 mais 6 mg de Cellic HTec por grama de biomassa seca.



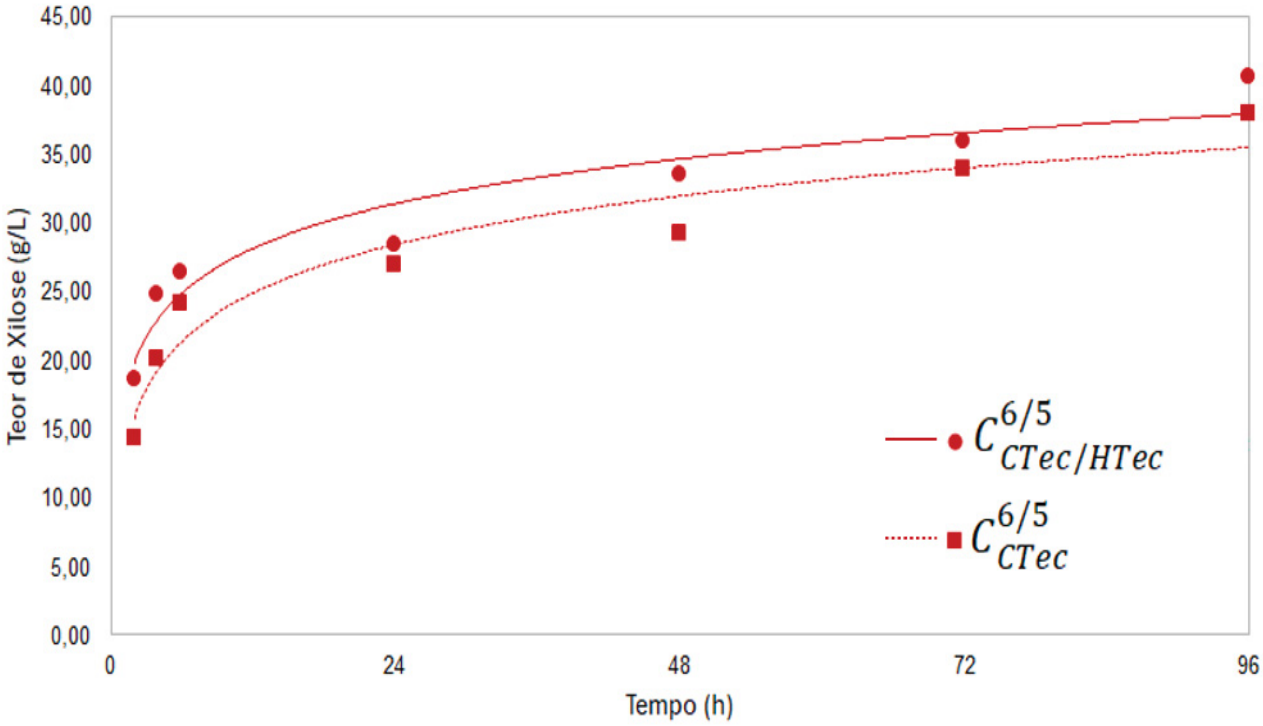
Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Tabela 9 – Ajuste matemático e coeficiente de determinação (R²) referentes à liberação de glucose dos hidrolisados enzimáticos.

Amostra	Ajuste matemático	Coeficiente de determinação (R²)
$C^{6/5}_{CTec/HTec}$	$y = 9{,}8563x^{0{,}4744}$	$R^2 = 0{,}9793$
$C^{6}_{CTec/HTec}$	$y = 8{,}1172x^{0{,}5027}$	$R^2 = 0{,}9900$
C^{6}_{CTec}	$y = 7{,}685x^{0{,}5054}$	$R^2 = 0{,}9912$
$C^{6/5}_{CTec}$	$y = 5{,}934x^{0{,}5458}$	$R^2 = 0{,}9916$

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Figura 20 - Liberação de xilose a partir de hidrólise enzimática da biomassa de Vertix 11 explodida a vapor para experimentos realizados a 15% (m·V^{-1}) WIS com 60 mg de Cellic CTec3 mais 6 mg de Cellic HTec por grama de biomassa seca.



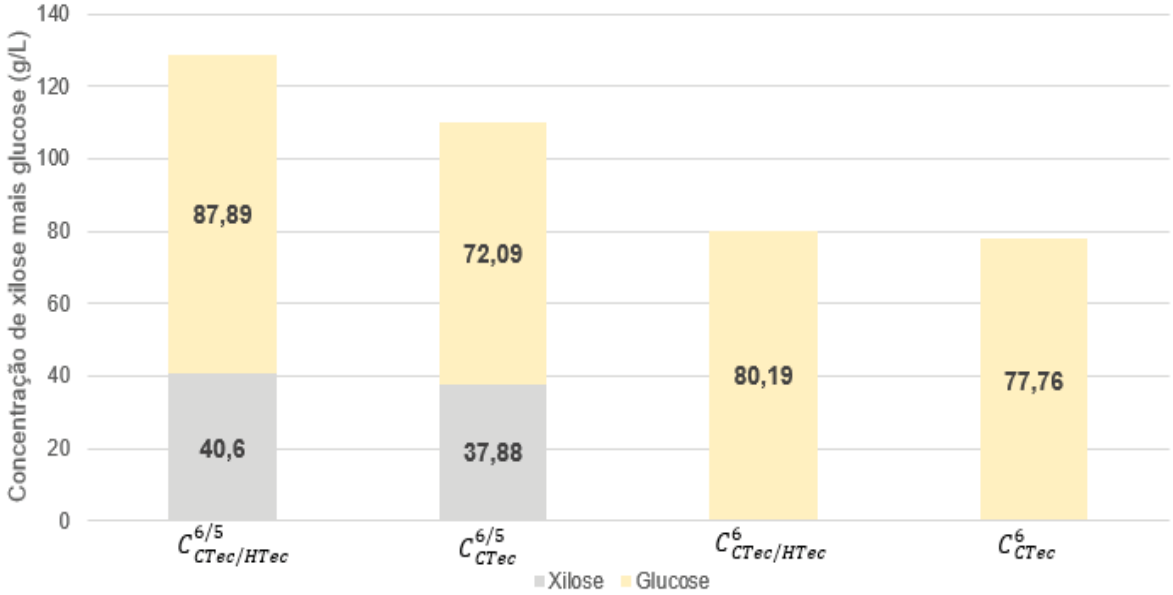
Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Tabela 10 – Ajuste matemático e coeficiente de determinação (R²) referentes à liberação de xilose dos hidrolisados enzimáticos.

Amostra	Ajuste matemático	Coeficiente de determinação (R²)
$C_{CTec/HTec}^{6/5}$	$y = 4{,}6943\ln(x) + 16{,}452$	$R^2 = 0{,}924$
$C_{CTec}^{6/5}$	$y = 5{,}0832\ln(x) + 12{,}249$	$R^2 = 0{,}9315$

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Figura 21 - Liberação de glucose mais xilose a partir de hidrólise enzimática da biomassa de Vertix 11 explodida a vapor para experimentos realizados a 15% (m·V^{-1}) WIS com 60 mg de Cellic CTec3 mais 6 mg de Cellic HTec por grama de biomassa seca.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Após 96 h de reação, a amostra Vertix 11 contendo a fração C5 hemicelulósica, na presença de ambas as enzimas (Cellic CTec3 e Cellic HTec3), apresentou a maior concentração de glucose, de 88,8 g·L^{-1}, enquanto a amostra contendo também a fração C5, mas sem a adição da Cellic HTec3, apresentou a menor concentração de glucose entre as amostras analisadas, com 72,1 g·L^{-1}. Já as outras duas amostras, sem o reaproveitamento da fração C5, obtiveram concentrações intermediárias de glucose, com valores de 80,2 g · L^{-1} e 77,8 g·L^{-1}, sendo o menor valor correspondente à amostra sem a presença da enzima Cellic HTec3 (**Figura 19**).

Os resultados sugerem que a enzima Cellic HTec3 apresenta maior eficiência catalítica na presença da fração C5 hemicelulósica, possivelmente devido à modulação do microambiente enzimático pelo próprio substrato, favorecendo interações conformacionais ideais para o reconhecimento e catálise. A presença dos polímeros hemicelulósicos pode conferir uma estabilidade estrutural à enzima, reduzindo efeitos de desnaturação e aumentando a acessibilidade ao sítio ativo, o que facilita a hidrólise das ligações glucosídicas e potencializa a liberação de xilose no meio reacional.

É importante ressaltar que as hidrólises na presença da fração C5 possuem,

naturalmente, maiores quantidades de açúcares totais disponíveis, considerando a xilose como o principal monossacarídeo presente no licor de pré-tratamento hemicelulósico. Esse licor contém não apenas xilose livre, mas também oligossacarídeos hemicelulósicos passíveis (como a arabinose) de hidrólise adicional pela Cellic HTec3, aumentando a disponibilidade de substrato fermentável. De acordo com a **Tabela 8** deste trabalho, há uma quantidade significativa de arabinose disponível na fração líquida (C5), o que facilita a liberação desse açúcar durante a reação de hidrólise enzimática.

Por esse motivo, observou-se a liberação adicional de xilose nas amostras que reaproveitaram a fração C5. A amostra Vertix 11 contendo o licor hemicelulósico, na presença da Cellic HTec3, apresentou um teor de 40,6 $g \cdot L^{-1}$ de xilose, enquanto a amostra sem a adição da enzima apresentou um teor ligeiramente inferior, de 37,9 $g \cdot L^{-1}$ (**Figura 20**). Esse resultado reforça a ação específica da Cellic HTec3 na conversão de oligossacarídeos hemicelulósicos remanescentes, indicando que sua atuação vai além da hidrólise da hemicelulose estrutural da biomassa original.

A glucose e a xilose, quando somadas, constituem um substrato de maior valor fermentativo, potencializando o rendimento de etanol. Essa maior disponibilidade de açúcares é viabilizada pelo reaproveitamento da fração C5, conforme demonstrado nos dados supracitados. Somando os dois monossacarídeos, as amostras contendo licor hemicelulósico superaram 100 $g \cdot L^{-1}$ de açúcares totais, sendo 110,0 e 128,5 $g \cdot L^{-1}$ para as amostras sem e com a presença da enzima Cellic HTec3, respectivamente (**Figura 21**). Enquanto isso, as amostras que não contêm o licor de pré-tratamento apresentaram valores significativamente inferiores, de 77,8 e 80,2 $g \cdot L^{-1}$, sem e com a presença da Cellic HTec3, respectivamente.

A análise dos dados indica que, após 96 horas de hidrólise, a amostra contendo o licor de pré-tratamento e com adição da enzima Cellic HTec3 (curva verde) apresentou uma liberação total de açúcares de 128,5 $g \cdot L^{-1}$, ou seja, um aumento de 16,8% na liberação de açúcares em comparação com a mesma amostra, mas sem adição da enzima Cellic HTec3. Embora o custo específico da Cellic HTec3 não seja amplamente divulgado e esteja em segredo industrial, sabe-se que as enzimas representam uma parcela significativa nos custos de produção de etanol de segunda geração (E2G), estimada em aproximadamente 20% do custo

total. Em termos de massa, a liberação total de açúcares por tonelada de biomassa processada foi de 1100,0 kg para a amostra contendo a fração C5, mas sem adição da enzima Cellic HTec3, e 1285,0 kg para a amostra contendo a fração C5 com adição da enzima Cellic HTec3, resultando em um incremento absoluto de 185,0 kg de açúcares fermentescíveis. Considerando um custo médio de R$ 115,20 para cada kg de enzima e uma dosagem de 2 kg por tonelada de biomassa, o investimento adicional em Cellic HTec3 seria de R$ 230,40 por tonelada. Com um preço médio de R$ 2,88 para cada kg de açúcar fermentescível, a receita adicional gerada seria de R$ 532,80 por tonelada, levando a um benefício líquido de R$ 302,40 por tonelada de biomassa processada.

Além disso, analisando o impacto no rendimento de etanol, a conversão dos açúcares resultaria na produção teórica de 632,2 kg de etanol por tonelada de biomassa para a amostra contendo a fração C5 com adição da enzima Cellic HTec3, enquanto a amostra sem adição de Cellic HTec3 resultaria na produção teórica de 541,2 kg de etanol por tonelada, representando um aumento de 91,0 kg de etanol, ou 16,8%. Com um preço médio de R$ 4,32 para cada kg de etanol, a receita adicional gerada pela maior produção de etanol seria de R$ 393,12 por tonelada. Ao considerar o custo adicional da enzima, o benefício líquido final se torna R$ 162,72 por tonelada, indicando que, sob as condições analisadas, a adição da Cellic HTec3 pode ser economicamente viável, especialmente se otimizações adicionais forem implementadas para reduzir custos enzimáticos ou aumentar a eficiência fermentativa.

Esses dados ressaltam a importância do reaproveitamento da fração C5 não apenas para maximizar o aproveitamento da biomassa lignocelulósica, mas também para proporcionar um ambiente enzimático mais propício à hidrólise eficiente da celulose e hemicelulose, resultando em um aumento significativo na carga fermentescível disponível para processos de bioconversão. Além disso, a ação sinérgica entre as enzimas Cellic CTec3 e Cellic HTec3 desempenha um papel crucial na obtenção de rendimentos elevados de açúcares fermentáveis, especialmente quando a fração líquida hemicelulósica está presente no meio reacional.

Em estudos similares, Maia (2023) realizou experimentos de hidrólise enzimática da biomassa de cana energia Vertix 11 pré-tratada por explosão a vapor (195°C por 7,5 min) a 15% ($m \cdot V^{-1}$) de sólidos insolúveis em água, utilizando 60,0 mg

da enzima Cellic CTec3 (Novozymes) por grama de biomassa. Comparando esses resultados com os obtidos no presente estudo sob as mesmas condições experimentais e tempo de reação, a autora obteve uma concentração de glucose liberada correspondente a 86,5 $g \cdot L^{-1}$. Nota-se uma similaridade nos valores obtidos neste estudo em relação aos de Maia (2023), o que pode ser atribuído às mesmas condições operacionais do pré-tratamento por explosão a vapor e da hidrólise enzimática. Entretanto, no presente estudo, foi considerada a injeção do licor hemicelulósico (fração líquida C5), reaproveitado na etapa de pré-tratamento, o que contribuiu para um aumento expressivo na concentração de açúcares fermentáveis, superando 100 $g \cdot L^{-1}$.

Neves *et al*. (2016) estudaram a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (195°C por 7,5 min) a 12% ($m \cdot V^{-1}$) de sólidos insolúveis em água, utilizando 62,5 mg da enzima Cellic CTec2 (Novozymes) por grama de bagaço (base seca). Os resultados indicaram uma concentração de glucose próxima a 92 $g \cdot L^{-1}$, superando os valores obtidos no presente estudo, mas sem o reaproveitamento da fração C5. Embora a carga enzimática utilizada tenha sido ligeiramente inferior, essa diferença não seria suficiente para explicar a disparidade nos rendimentos observados. Assim, a variação provavelmente decorre da diferença na concentração de sólidos, que foi 20% menor nos experimentos realizados por Neves et al. (2016).

Em um estudo semelhante, Fockink *et al*. (2018) conduziram ensaios de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado por explosão a vapor (195°C por 15 min), utilizando 15% ($m \cdot V^{-1}$) de sólidos insolúveis em água e 4,6 mg da enzima Cellic CTec3 (Novozymes) por grama de bagaço, com base no teor de glucanas presente na amostra. Nessas condições, o rendimento de glucose obtido foi de 86 $g \cdot L^{-1}$, valor semelhante aos apresentados na Figura 18.

6.5 FERMENTAÇÃO

Para examinar a capacidade fermentativa dos hidrolisados enzimáticos gerados a partir dos substratos submetidos ao pré-tratamento, as amostras hidrolisadas foram submetidas a um processo de fermentação de 24 h em um reator de agitação orbital (Infors, modelo Multifors) utilizando a levedura (Celere-2L),

conforme detalhado na seção 5.7.2. Primeiramente, após o processo de hidrólise enzimática, foram realizados ensaios preliminares de fermentação para avaliar a capacidade inibitória da fração C5 reconstituída à fibra C6. Nesse sentido, as amostras hidrolisadas contendo a injeção da fração C5 foram imediatamente submetidas ao processo de remoção de inibidores, conforme descrito na seção 5. 7.3, pois na presença de componentes inibitórios, a fermentação não foi bem-sucedida mesmo após 46 h de reação.

A **Tabela 11** mostra a fermentação preliminar dos hidrolisados enzimáticos de C6 e C5 mais C6 (mosto integral reconstituído do pré-tratamento) pela levedura Celere-2L. O uso das injeções da fração C5 não tratadas para reconstituir os mostos integrais do pré-tratamento resultou em hidrolisados enzimáticos altamente inibitórios. O consumo de açúcares, o teor de etanol e a eficiência fermentativa foram muito baixos em comparação com o desempenho da fermentação da corrente de C6.

Tabela 11 - Parâmetros de fermentação para as amostras Vertix 11 C^{6}_{CTec}, $C^{6/5}_{CTec/HTec}$ e $C^{6/5}_{CTec/HTec}$* utilizando Celere-2L como o organismo fermentador.

Parâmetros	C^{6}_{CTec}	$C^{6/5}_{CTec/HTec}$	$C^{6/5}_{CTec/HTec}$*
Glucose inicial ($g \cdot L^{-1}$)	81,6 ± 0,4	80,2 ± 0,8	77,1 ± 0,7
Xilose inicial ($g \cdot L^{-1}$)	7,5 ± 0,6	33,7 ± 0,3	28,6 ± 0,2
Etanol teórico ($g \cdot L^{-1}$)	45,4	58,1	53,9
Etanol experimental ($g \cdot L^{-1}$)	33,7 ± 0,3	2,3 ± 0,1	50,2 ± 0,2
Rendimento de etanol ($g \cdot g^{-1}$)[1]	0,38	0,02	0,48
Rendimento de etanol (%)[2]	74,5	3,9	94,1

[1] É o rendimento fermentativo de etanol das amostras (base de massa).

[2] É a eficiência fermentativa de etanol das amostras, que é expresso em relação ao rendimento de etanol teórico.

* É a amostra $C^{6/5}$ que passou pelo processo de destoxificação por evaporação.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Dessa forma, devido às suas propriedades químicas e físicas, tanto o HMF como furfural possuem pontos de ebulição relativamente baixos, possibilitando assim a sua remoção por evaporação. Assim, um rota-evaporador (IKA, modelo RV 10 digital) foi utilizado para remoção dos compostos furânicos nos hidrolisados que continham a fração hemicelulósica, a fim de eliminar o seu poder inibitório e facilitar

o processo de fermentação. Sequencialmente, as amostras foram analisadas via HPLC, conforme descrito na seção 5.4, para quantificar a concentração de furânicos após evaporação. A **Tabela 12** apresenta a eficiência obtida na remoção desses compostos, comparando as suas concentrações inicial e final. Foram removidos, em média, 72,8% de HMF, e 97,8% de furfural das amostras V11 com reaproveitamente da fração C5.

Tabela 12 – Concentração de HMF e furfural antes (inicial) e depois (final) do processo de remoção em rota-evaporador.

Amostra	Concentração ($g \cdot L^{-1}$)			
	Inicial		Final	
	HMF	Furfural	HMF	Furfural
C6/C5	0,563 ±0,016	1,625 ± 0,025	0,153 ± 0,005	0,036 ± 0,003

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

De acordo com Taherzadeh *et al*. (2011), as concentrações críticas inibitórias para a fermentação por leveduras variam entre 1,0 e 2,5 $g \cdot L^{-1}$ de compostos furânicos totais. No presente estudo, a soma das concentrações iniciais de 0,563 $g \cdot L^{-1}$ de HMF e 1,625 $g \cdot L^{-1}$ de furfural resultou em um total de 2,188 $g \cdot L^{-1}$ de componentes inibitórios. Os furanos são os principais responsáveis pela inibição dos processos fermentativos, pois inibem enzimas da via glicolítica (por exemplo, enolases e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases), reduzindo a produção de ATP e o suprimento de intermediários para a fermentação (WANG *et al*., 2023). Além disso, a conversão de furfural em álcool furfurílico é comprometida quando o furfural está presente em altas concentrações (LI *et al*., 2019). Por outro lado, o ácido acético e os compostos fenólicos inibem o crescimento celular e a taxa de fermentação, desestabilizando a membrana celular e diminuindo o pH intracelular (ALMEIDA *et al*., 2023).

Após análise da redução das concentrações de furânicos nos hidrolisados, ficando abaixo do limite crítico de inibição, foi possível repetir o processo fermentativo das amostras apresentadas na Seção 6.4, mantendo as mesmas condições operacionais. A **Tabela 13** apresenta a concentração inicial de glucose e xilose, a concentração final de etanol, a produção teórica de etanol e o rendimento fermentativo alcançado. Os resultados apresentados foram obtidos a partir de experimentos

realizados em duplicata.

Tabela 13 - Parâmetros de fermentação para as amostras hidrolisadas Vertix 11 utilizando Celere-2L como o organismo fermentador.

Parâmetros	$C^{6}_{CTec/HTec}$	C^{6}_{CTec}	$C^{6/5}_{CTec}$	$C^{6/5}_{CTec/HTec}$
Glucose inicial (g·L^{-1})	68,8 ± 0,5	68,0 ± 0,4	54,5 ± 0,3	63,4 ± 0,4
Xilose inicial (g·L^{-1})	5,3 ± 0,6	2,9 ± 0,5	31,8 ± 0,4	31,9 ± 0,5
Etanol teórico (g·L^{-1})	37,8	36,2	44,0	48,6
Etanol experimental (g·L^{-1})	31,0 ± 0,3	31,8 ± 0,3	43,0 ± 0,6	47,5 ± 0,4
Rendimento de etanol (g·g^{-1})[1]	0,45	0,42	0,50	0,50
Rendimento de etanol (%)[2]	82,03	87,94	97,70	97,73

[1] Rendimento fermentativo de etanol das amostras (base de massa).

[2] Eficiência fermentativa de etanol das amostras, que é expresso em relação ao rendimento de etanol teórico.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Na **Tabela 13**, observa-se que o potencial fermentativo das amostras apresentou algumas variações. Nota-se que, nas amostras contendo a fração C5 reaproveitada, o rendimento de etanol atingiu 97,70% e 97,73% para $C^{6/5}_{CTec}$ e $C^{6/5}_{CTec/HTec}$, respectivamente. Por outro lado, nas amostras contendo apenas a fração fibrosa, os rendimentos foram 87,94% e 82,03% para C^{6}_{CTec} e $C^{6}_{CTec/HTec}$, respectivamente. Isso representa uma redução de 11,1% e 15,5% no rendimento de etanol, em comparação com as amostras que receberam a adição do licor do pré-tratamento, mesmo sob as mesmas condições operacionais e utilizando o mesmo coquetel enzimático.

Esse fator pode ser justificado pela maior concentração inicial de glucose e xilose presente nas amostras contendo o licor de pré-tratamento, que são superiores aos das amostras sem adição do licor. Essa diferença na concentração inicial de glucose e xilose aumentou a produção e o rendimento de etanol a partir dos hidrolisados das amostras com adição de C5, uma vez que a levedura Celere-2L fermenta tanto pentoses quanto hexoses. Nas amostras contendo a fração líquida C5, houve uma diminuição significativa na concentração de glucose inicial, com valores de 54,5 g·L^{-1} ($C^{6/5}_{CTec}$) e 63,4 g·L^{-1} ($C^{6/5}_{CTec/HTec}$), contudo a concentração total de glucose mais xilose no meio apresentou 86,3 g·L^{-1} e 95,3 g·L^{-1} para essas

mesmas amostras, respectivamente. Com isso, o rendimento fermentativo aumenta, atingindo melhores condições para viabilizar o reaproveitamento da fração hemicelulósica juntamente ao mosto integral da biomassa pré-tratada, aumentando a recuperação de etanol do mosto fermentado via destilação.

Com base na linha de rendimento de etanol (%), é possível estimar a quantidade de etanol produzido a partir de 1 kg de biomassa em cada condição experimental. O rendimento fermentativo indica a eficiência da conversão dos açúcares presentes no meio em etanol. Considerando um rendimento teórico de 100%, o experimento $C^{6/5}_{CTec/HTec}$ apresentou o maior aproveitamento, atingindo 97,73%, seguido pela condição $C^{6/5}_{CTec}$, com 97,70%, o que indica que essas condições foram mais eficazes na conversão dos açúcares fermentáveis disponíveis. Já o experimento C^{6}_{CTec}obteve um rendimento de 87,94%, enquanto o $C^{6}_{CTec/HTec}$ teve o menor desempenho relativo, com 82,03%. Assim, ao partir de 1 kg de biomassa e assumindo uma conversão proporcional, os experimentos de maior rendimento resultariam em uma produção próxima ao máximo teórico esperado, enquanto os de menor rendimento indicam que há perdas no processo, possivelmente devido à limitações no metabolismo da levedura Celere-2L. Isso reforça que a escolha da condição fermentativa influencia diretamente na quantidade final de etanol obtida.

Durante os ensaios de fermentação, o consumo de glucose se estabilizou em 24 h de incubação. Nesse período, as concentrações de etanol atingiram 31,0 $g \cdot L^{-1}$ ($C^{6}_{CTec/HTec}$), 31,8 $g \cdot L^{-1}$ (C^{6}_{CTec}), 44,0 $g \cdot L^{-1}$ ($C^{6/5}_{CTec}$) e 47,5 $g \cdot L^{-1}$ ($C^{6/5}_{CTec/HTec}$) para os hidrolisados. Observa-se que as amostras que reaproveitaram a fração C5 apresentaram maior eficiência fermentativa em comparação com aquelas que utilizaram apenas a fração fibrosa. Esse efeito é evidenciado pelas concentrações finais de etanol superiores a 40 $g \cdot L^{-1}$ nas amostras $C^{6/5}_{CTec}$ e $C^{6/5}_{CTec/HTec}$, indicando um melhor aproveitamento dos açúcares fermentáveis. Esse desempenho foi alcançado devido à etapa adicional de evaporação da fração líquida hemicelulósica, a qual permitiu a remoção de compostos inibitórios como furfural e HMF. Embora essa estratégia tenha resultado em concentrações de etanol superiores a 40 $g \cdot L^{-1}$, contribuindo para a viabilidade econômica do processo, a necessidade de uma etapa extra de evaporação implica em custo adicional que deve ser considerado na

análise do processo em escala industrial.

Segundo Dimos *et al*. (2019), para que a recuperação de etanol a partir de hidrolisados fermentados seja economicamente viável, sua concentração final deve ser igual ou superior a 40 $g \cdot L^{-1}$. Assim, os resultados obtidos neste estudo demonstram que o reaproveitamento da fração C5 foi uma estratégia eficaz, pois permitiu alcançar concentrações de etanol acima do limite mínimo estabelecido para viabilidade econômica.

Na **Tabela 13**, a adição da enzima Cellic HTec3 na hidrólise das amostras contendo a fração C5 resultou em um aumento na produção de etanol, atingindo 47,5 $g \cdot L^{-1}$ para a amostra $C^{6/5}_{CTec/HTec}$, contra 43,0 $g \cdot L^{-1}$ para a amostra $C^{6/5}_{CTec}$, que não recebeu a adição da enzima. Esse aumento de 4,5 $g \cdot L^{-1}$ representa uma melhora de aproximadamente 10,5% na concentração final de etanol.

A análise da viabilidade econômica desse incremento deve levar em consideração tanto o valor do etanol gerado quanto o custo adicional da enzima utilizada. Considerando que a densidade do etanol é 0,789 $g \cdot mL^{-1}$, o volume adicional de etanol produzido equivale a aproximadamente 5,7 mL de etanol por litro de fermentado. Com um preço médio do etanol estimado em R$3,50 por litro, a receita adicional gerada por esse aumento seria de R$19,96 por 1000 litros de fermentado.

Entretanto, esse ganho deve ser comparado ao custo do uso do Cellic HTec3. Assumindo um consumo médio de 2 $g \cdot L^{-1}$ da enzima e um custo estimado de R$115,20 para cada kg de enzima, o impacto financeiro da adição do Cellic HTec3 seria de R$0,24 por litro de fermentado. Ao subtrair esse valor da receita extra obtida com a maior produção de etanol, observa-se que a margem líquida de viabilidade econômica do uso da enzima é de aproximadamente R$19,72 por 1000 litros de fermentado, o que demonstra um retorno financeiro positivo.

Além da questão econômica direta, a maior concentração de etanol final nas amostras contendo Cellic HTec3 pode beneficiar o processo industrial de destilação, reduzindo o consumo energético por litro de etanol recuperado. De acordo com Dimos *et al*. (2019), concentrações superiores a 40 $g \cdot L^{-1}$ são um critério importante para viabilizar economicamente a recuperação de etanol a partir de hidrolisados fermentados. Nesse contexto, ambas as amostras contendo a fração C5 já atendem a esse requisito, mas a maior produção na condição com Cellic

HTec3 pode tornar o processo ainda mais eficiente.

Portanto, a adição de Cellic HTec3 na hidrólise da fração C5 demonstrou um impacto positivo na produção de etanol e, com base na relação custo-benefício calculada, representa ser uma estratégia economicamente viável para otimizar o rendimento fermentativo. Contudo, a decisão final sobre a implementação desse método deve considerar a escala industrial, o custo real das enzimas no mercado e possíveis ganhos adicionais em eficiência energética e operacionais na destilaria.

Em estudos similares, Maia (2023) realizou ensaios de fermentação em biorreator com volume útil de 300 mL, a 30°C e 100 rpm por 24 h, utilizando a levedura *S. cerevisiae.* O rendimento de etanol atingido pela pesquisadora foi de 83,0% para amostras de biomassa Vertix 11, sem o reaproveitamento da fração líquida hemicelulósica, com concentração inicial de glucose de 80 $g \cdot L^{-1}$. Comparando estes resultados aos obtidos neste estudo, essa diferença pode estar atribuída a utilização de diferentes organismos fermentescíveis entre as duas pesquisas, na qual Maia (2023) utilizou *S. cerevisiae*, que fermenta apenas hexoses, como a glucose, enquanto neste estudo foi utilizada a levedura Celere-2L, que fermenta tanto hexoses quanto pentoses. Isso dá à Celere-2L uma vantagem com o reaproveitamento da fração C5, permitindo maior rendimento de etanol ao se aproveitar ambos os tipos de açúcares, resultando em uma maior preferência do organismo em fermentar pentoses, principalmente a xilose, que se apresenta em maiores concentrações nas amostras com adição de C5, por exemplo.

Neves *et al*. (2016) utilizaram bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor sob condições similares (195°C por 7,5 min) e, após fermentação, alcançaram um rendimento de 85,5% (25,2 $g \cdot L^{-1}$ de etanol) a partir de um hidrolisado contendo 57,8 $g \cdot L^{-1}$ de glucose. Em estudo similar, Da Silva *et al*. (2016) avaliaram a fermentabilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado por explosão a vapor seguido de extração alcalina. A maior eficiência fermentativa, de 91,4%, foi obtida com a amostra lavada com álcali, enquanto o material tratado, somente por explosão a vapor e sem lavagens, resultou em 25,6 $g \cdot L^{-1}$ de etanol, com um rendimento de 87,1%.

Dionísio *et al*. (2021) conduziram um estudo sobre a produção de etanol celulósico a partir de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. O hidrolisado enzimático do material lavado com água (fração C6)

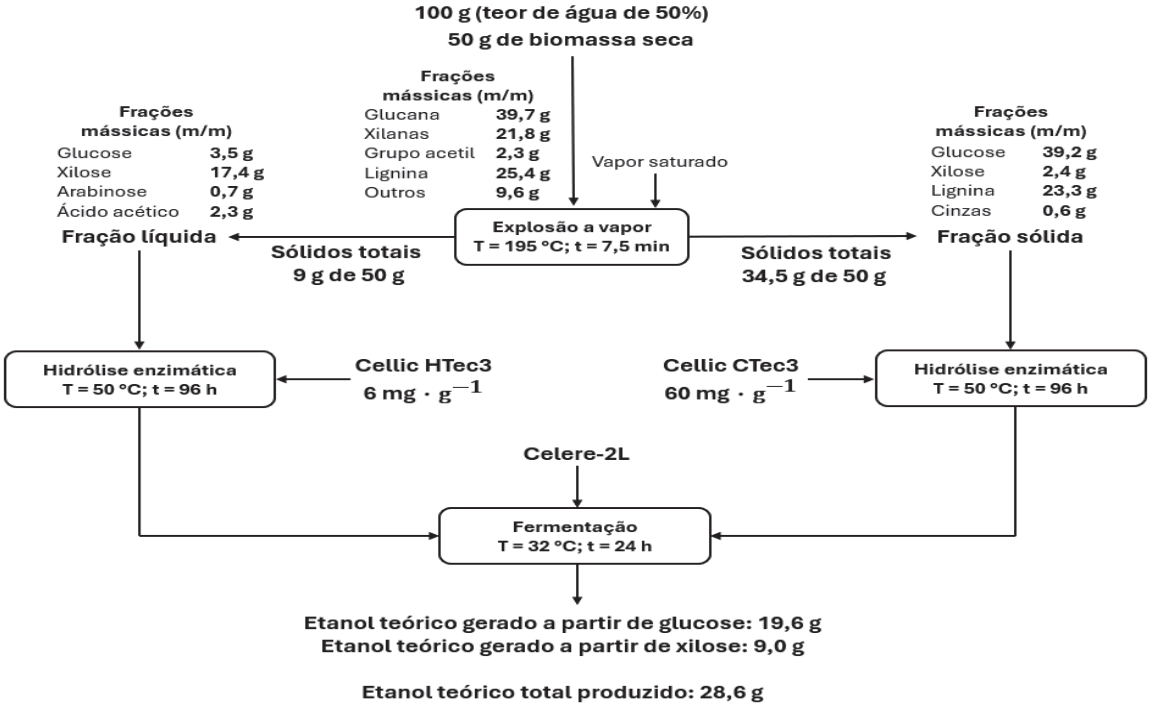
foi fermentado utilizando *S. cerevisiae* CAT-1 em um processo descontínuo com reciclagem de células, resultando em uma conversão máxima de 80% e uma concentração de etanol de 50,1 $g \cdot L^{-1}$, partindo de um hidrolisado contendo 123,8 $g \cdot L^{-1}$ de glucose.

Saini e Hemansi (2023) exploraram a sacarificação e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar utilizando um pré-tratamento químico sequencial com 3% de H_2SO_4 e 5% de NaOH. A levedura utilizada foi uma cepa modificada de *Kluyveromyces marxianus*, adaptada para tolerar altas concentrações de inibidores. Nos experimentos de fermentação em separado (SHF), a concentração máxima de etanol obtida foi de 55 $g \cdot L^{-1}$, com uma eficiência de 87%.

7 BALANÇO MÁSSICO

Com base nos percentuais de recuperação mássica do pré-tratamento e na eficiência das etapas de hidrólise enzimática e fermentação, foi elaborado um balanço mássico da produção de etanol utilizando as amostras Vertix 11. A **Figura 22** mostra, de maneira simplificada, a quantidade de etanol gerada a partir de 100 g de biomassa submetida ao pré-tratamento a vapor.

Figura 22 – Produção de E2G a partir do pré-tratamento a vapor, hidrólise enzimática e fermentação das amostras Vertix 11.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Ao examinar os dados apresentados na **Figura 22**, observa-se que a produção de etanol a partir da biomassa de cana energia Vertix 11 atingiu aproximadamente 28,6 g. Esse valor equivale a uma produção de 286 kg ou 362,5 litros de etanol por tonelada de biomassa seca. Conforme informações da GranBio (2025), a produtividade média de fibra da Vertix 11 no primeiro corte é de 36,7 $t \cdot ha^{-1}$, enquanto a cana-de-açúcar convencional apresenta uma produtividade inferior, em torno de 15,6 $t \cdot ha^{-1}$. Com essa produtividade, a Vertix 11 é capaz de gerar 13.304 $L \cdot ha^{-1}$ de etanol oriundo da fração C6 mais C5 (hexoses e pentoses), em comparação com 5.655 $L \cdot ha^{-1}$ do cultivar de cana-de-açúcar convencional.

A principal vantagem da cana energia em relação à cana-de-açúcar tradicional reside na sua maior capacidade de gerar biomassa por unidade de área cultivada. Os resultados obtidos indicam que a variedade Vertix 11 se destaca como uma alternativa promissora para a produção de etanol, uma vez que apresenta uma alta taxa de recuperação de massa após a explosão a vapor, boa conversão durante a hidrólise enzimática e elevada produtividade agrícola. Além disso, seus teores de açúcares redutores totais e de fibras na biomassa são consideravelmente altos, tornando-a uma excelente opção para a produção integrada de etanol de primeira e segunda geração.

Outro aspecto relevante da Vertix 11 é sua capacidade de manter uma produtividade elevada após o primeiro corte. Estima-se que, no terceiro corte da cana energia, seja possível obter cerca de 6668 $L \cdot ha^{-1}$ de etanol, enquanto a cana-de-açúcar convencional, devido à queda na produção de bagaço, teria um rendimento de apenas 1.193 $L \cdot ha^{-1}$. Considerando uma eficiência de 90% no processo de primeira geração, a Vertix 11 poderia produzir aproximadamente 7.887 $L \cdot ha^{-1}$ de etanol, enquanto a cana-de-açúcar convencional alcançaria cerca de 8.283 $L \cdot ha^{-1}$. No entanto, ao considerar a produção de etanol a partir das rotas de primeira e segunda geração, os rendimentos integrados atingiriam 10.513 e 15.180 $L \cdot ha^{-1}$ para a cana-de-açúcar convencional e Vertix 11, respectivamente. Esse alto potencial produtivo da Vertix 11 é resultado, entre outros fatores, do aproveitamento da fração hemicelulósica (fração C5) no processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica.

A adição do licor do pré-tratamento permitiu a obtenção de concentrações elevadas de etanol, superiores ao mínimo necessário para viabilização econômica do processo. Os achados deste estudo são relevantes no contexto da literatura científica, visto que ainda há pouca informação sobre o reaproveitamento da fração C5 e a utilização da levedura geneticamente modificada Celere-2L para fermentação

simultânea de pentoses e hexoses.

Pesquisas anteriores apresentaram resultados comparáveis. Dionísio *et al*. (2021) reportaram uma produção de 197,9 kg de etanol por tonelada de bagaço seco, utilizando pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e co-fermentação de pentoses e hexoses. Desse total, a fermentação das hexoses contribuiu com 99,1 kg de etanol. O processo incluiu uma hidrólise enzimática de 72 horas, empregando 10 FPU de enzima por grama de material seco.

Por outro lado, Maia (2023) relatou um rendimento de 156,8 kg de etanol por tonelada de biomassa seca da Vertix 11, sem considerar o reaproveitamento do licor do pré-tratamento por explosão a vapor (195°C por 7,5 minutos). A hidrólise enzimática foi realizada com 15% de sólidos insolúveis em água e uma carga enzimática de 60 mg de Cellic CTec3 por grama de substrato, com tempo de reação de 96 horas. As condições de fermentação foram semelhantes às aplicadas neste estudo.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para a composição química das amostras de cana energia não mostraram diferenças em comparação às amostras da literatura, particularmente nos teores de carboidratos como glucanas e hemiceluloses. Em relação aos teores de lignina, as amostras Vertix 11 lavadas e não lavadas apresentaram uma diferença pouco significativa entre ambas, com 3,1 pontos percentuais acima da média para o Vertix 11 que passou pela etapa de lavagem aquosa antes do pré-tratamento.

O processo de explosão a vapor demonstrou ser eficaz no fracionamento dos três principais componentes macromoleculares das amostras de cana energia, promovendo a solubilização da fração hemicelulósica e uma alta recuperação de glucanas na fração sólida fibrosa. Nesse contexto, as amostras Vertix 11 que não passaram pelo processo de lavagem aquosa antes do pré-tratamento se destacaram com poucas diferenças estatisticamente significativas em termos de recuperação mássica quando comparadas às amostras lavadas. No entanto, é importante considerar a possibilidade de perdas físicas durante o processo, já que ele foi realizado em um reator de batelada.

Nos ensaios realizados com a 15% ($m \cdot V^{-1}$) de sólidos insolúveis em água, as amostras Vertix 11 apresentaram valores de hidrólise compatíveis com os dados disponíveis na literatura. Nas condições experimentais adotadas, todas as amostras Vertix 11 analisadas neste estudo alcançaram concentrações de glucose superiores a 72 $g \cdot L^{-1}$. Destaque-se que as amostras Vertix 11 com adição da fração hemicelulósica (C5) atingiram, além das concentrações de glucose, concentrações de xilose superiores a 37 $g \cdot L^{-1}$.

Os títulos de etanol obtidos a partir dos ensaios de fermentação foram determinados para analisar a ação enzimática das duas enzimas e ao meio recional com ou sem injeção do licor hemicelulósico, oriundos de cada configuração. Para as amostras que reaproveitaram a fração C5, estas apresentaram maior eficiência fermentativa em comparação com aquelas que utilizaram apenas a fração fibrosa. Esse efeito é evidenciado pelas concentrações finais de etanol superiores a 40 $g \cdot L^{-1}$ nas amostras $C_{CTec}^{6/5}$ e $C_{CTec/HTec}^{6/5}$, indicando um melhor aproveitamento dos açúcares fermentáveis.

Ademais, a utilização da fração líquida hemicelulósica exigiu uma etapa adicional antes da fermentação, que foi o processo de evaporação parcial para redução da concentração de inibidores. A etapa reduziu de forma significativa a quantidade de compostos furânicos nesses hidrolisados e adequou-se de forma eficaz à produção de etanol celulósico, uma vez que os rendimentos de etanol (%) foram superiores quando comparados aos hidrolisados de cana energia sem a presença da fração C5. Assim, os resultados obtidos neste estudo demonstram que o reaproveitamento da fração C5 foi uma estratégia eficaz, pois permitiu alcançar concentrações de etanol acima do limite mínimo estabelecido para tornar o processo, de fato, viável economicamente.

8.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos neste estudo, algumas perspectivas de continuidade podem ser consideradas para aprofundamento da investigação sobre a produção de etanol de segunda geração (E2G) a partir da cana-energia Vertix 11.

A otimização do pré-tratamento a vapor, com variações controladas de temperatura, tempo de residência e severidade, poderá proporcionar uma melhor eficiência no fracionamento da biomassa e aumentar a recuperação de açúcares fermentescíveis, alinhando-se às tendências de intensificação de processos. Além disso, a aplicação de técnicas alternativas de detoxificação da fração hemicelulósica, como o uso de carvão ativado, resinas de troca iônica ou técnicas de separação por membranas, representa uma oportunidade para reduzir ainda mais a concentração de compostos inibidores, favorecendo o desempenho fermentativo.

A avaliação da escalabilidade do processo em sistemas de operação contínua ou semi-contínua também se configura como uma etapa essencial para a validação industrial da estratégia proposta, permitindo a análise da robustez operacional em condições mais próximas da realidade comercial. A utilização de coquetéis enzimáticos otimizados ou microrganismos geneticamente modificados, capazes de metabolizar simultaneamente hexoses e pentoses, representa uma abordagem promissora para maximizar o aproveitamento dos açúcares presentes na biomassa.

Ademais, torna-se fundamental, em estudos futuros, a caracterização completa da atividade enzimática dos coquetéis utilizados, a fim de correlacionar diretamente a eficiência da hidrólise com o rendimento fermentativo. Avaliações mais precisas da via

metabólica empregada pelos microrganismos, bem como o monitoramento rigoroso da quantidade de inóculo adicionada nos ensaios, são igualmente relevantes, pois impactam diretamente na dinâmica de consumo de açúcares e na produtividade de etanol. Sugere-se, ainda, a realização de análises de açúcares redutores (por método de DNS) e de açúcares totais ao longo do processo, possibilitando uma compreensão mais aprofundada das taxas de hidrólise e fermentação. Ressalta-se que, no presente trabalho, a atividade enzimática dos complexos utilizados e a concentração de inóculo empregada não foram determinadas, o que limita a correlação direta entre as condições experimentais e os rendimentos observados, reforçando a importância desses parâmetros para o aprimoramento de futuros estudos.

Por fim, recomenda-se a realização de estudos de análise econômica e de avaliação de ciclo de vida (LCA) para o processo integrado com reaproveitamento da fração C5, a fim de consolidar a viabilidade técnico-econômica e ambiental da tecnologia, contribuindo para a competitividade do E2G frente a combustíveis fósseis e biocombustíveis convencionais.

REFERÊNCIAS

ABBI – Associação Brasileira de Bioinovação (2024). Disponível em:< https://abbi.org.br/>. Acesso em 15 de dez. 2024.

AFEDZI, A. E. K.; RATTANAPORN, K.; PARAKULSUKSATID, P. Impeller selection for mixing high-solids lignocellulosic biomass in stirred tank bioreactor for ethanol production. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, p. 100935, 2022.

AGRAWAL, A.; KAUSHIK, N.; BISWAS, S. Derivatives and Applications of Lignin – An Insight. **The Scitech Journal**. v. 1, n. 07, p. 30-36, 2014.

AGRAWAL, R; VERMA, A; SINGHANIA, R, R; VARJANI, S; DONG, C. D; PATEL, A. K. Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 332, p. 125042, 2021.

AGUIAR, R. R. **Produção de Etanol de Segunda Geração**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

AKIZUKI, M; FUJII, T; HAYASHI, R; OSHIMA, Y. Effects of water on reactions for waste treatment, organic synthesis, and bio-refinery in sub- and supercritical water. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 1, p. 10–18, 2014.

AL-MARDEAI, S; ELNAJJAR, E; HASHAIKEH, R; KRUCZEK, B; BRUGGEN, B. V. D;

AL-ZUHAIR, S. Radial flow tubular membrane bioreactor for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic waste biomass. **Fuel**, v. 341, p. 127648, 2023.

ALMEIDA, J.R.M; WIMAN, M; HEER, D; BRINK, D.P; SAUER, U; HAHN-HAGERDAL, B; LIDEN, G; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Physiological and molecular characterization of yeast cultures pre-adapted for fermentation of lignocellulosic hydrolysate. **Fermentation**. v. 9, p. 72, 2023.

ALMEIDA, C.S; NASCIMENTO, D.D; Revisão: leveduras utilizadas na produção de etanol de segunda geração. **Bioenergia em Revista: Diálogos** (ISSN: 2236- 9171), v. 11, n. 1, p. 99- 119, 2021.

ÁLVAREZ, C; GONZÁLEZ, A; NEGRO, M. A; BALLESTEROS, I; OLIVA, J. M; SÁEZ, F. Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value- added xylooligosaccharides. **Industrial Crops and Products**, v. 99, p.41-48, 2017.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic

hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ANP (2024). **Painéis Dinâmicos sobre Combustíveis. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Rio de Janeiro. Disponível em: https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/paineis-dinamicos-da-anp/paineis-dinamicos-sobrecombustiveis. Acesso em 05 de jan. 2025.

ANTUNES, F. A. F; KALAVATHY, R; ANGELE, D; MOURA, T. R; PEREIRA, L. B; CRISTHINE, S. M. Y; DOS SANTOS, J. C; ROSA, C. A; CARRIER, D. J; DA

SILVA, S. S. Sustainable second-generation ethanol production from switchgrass biomass via co-fermentation of pentoses and hexoses using novel wild yeasts. **BioEnergy Research**, v. 1, p. 1-12, 2021.

APARICIO, E; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M; PINALES-MÁRQUEZ, C. D; LOREDO-TREVINÕ, A; ROBLEDO-OLIVO, A; AGUILAR, C. N; KASTAS, E. T; RUIZ, H. A. High-pressure technology for Sargassum spp biomass pretreatment and fractionation in the third generation of bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 329, p. 124935, 2021.

ARAÚJO, C. R; GORRIDO, C. V. S; SANTOS, J. M. G. M; LEAL, S. C. S; CAMPOS, L. M. A. Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos. **Revista Eletrônica SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica**, UNIFACS, V. 12, 2013.

BAIN & COMPANY; GAS ENERGY (2014). **Potencial de diversificação da indústria química: Químicos com base em fontes renováveis**. Disponível em <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/15322>. Acesso em 07 de jan. 2025.

BAGHAEI, B.; SKRIFVARS, M. All-Cellulose Composites: A Review of Recent Studies on Structure, Properties and Applications. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2836, 2020.

BRASIL – Diário Oficial da União (2021). **RESOLUÇÃO CONTRAN Nº 847, DE 8 DE ABRIL DE 2021**. Disponível:<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-contran-n-847-de-8-de-abril-de-2021-313197700. Acesso em 17.11.2021>. Acesso em 12 de jan. 2025.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Fontes renováveis atingem 49,1% na matriz energética brasileira**. Brasília, 2023. Disponível em:<https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/noticias/fontes-renovaveis-atingem-49-1-na-matriz-energetica-brasileira>. Acesso em: 4 mar. 2025.

BAZOTI, S. F; GOLUNSKI, S; SIQUEIRA, D. P; SCAPINI, T; BARRILLI, E. T; MAYER, D. A; BARROS, K O; ROSA, C. A; STAMBUK, B. U; ALVES, S. L; VALÉRIO, A.

OLIVEIRA; D; TREICHEL, H. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 582-587, 2017.

BHATIA, S. K; JAGTAP, S. S; BEDEKAR, A. A; BHATIA, R. K; PATEL, A. K; PANT, D; BANU, J. R; RAO, C. V; KIN, Y. G; TANG, Y. H. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource technology**, v. 300, p.122724, 2020.

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (2024). Disponível em:< https://www.bndes.gov.br/wps/portal/site/home>. Acesso em 17 de dez. 2024.

BRIENZO, M. **Extração da hemicellulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeo**. 2010. 137 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo- SP.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p.199-204, 2009.

BRISTOTI, A; SILVA, S; JAIRO, L. S. 1993. Diagnóstico da utilização e da oferta da biomassa vegetal no Rio Grande do Sul, **Núcleo de Energia, PROMEC, UFRGS**, Porto Alegre.

CAI, X; HU, C. H; WANG, J; ZENG, X. H; LUO, J. X; LI, M; LIU, Z. Q; ZHENG, Y. G. Efficient high-solids enzymatic hydrolysis of corncobs by an acidic pretreatment and a fed-batch feeding mode. **Bioresource Technology**, v. 326, p. 124768, 2021.

CARVALHO-NETTO, O. V; BRESSIANI, J. A; SORIANO, H. L; FIORI, C. S; SANTOS, J. M; BARBOSA, G; XAVIER, M. A; LANDELL, M. G; PEREIRA, G. A. The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2014.

CASTRO, A. M. D; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CHATURVEDI, V.; VERMA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value-added products. **3Biotech**, v.3, p. 415-431, 2013.

CHUNDAWAT, S. P. S; BECKHAM, G. T; HIMMEL, M. E; DALE, B. E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. Volume 2, 2011, p. 121–145, 15 jul. 2011. CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar. Primeiro levantamento, v.

1, Safra 2024/25, 2024. Disponível em:<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 27 abr. 2024.

CGEE - **Relatório prospecção etanol de segunda geração - E2G 2030**. Brasilía, DF, 2025. Disponível em:<www.cgee.org.br.> Acesso em 03 de jan. 2025.

CRUZ, N. C.; SILVA, F. C.; TARELHO, L. A. C.; RODRIGUES, S. M. Critical review of key variables affecting potential recycling applications of ash produced at largescale biomass combustion plants. **Resources, Conservation and Recycling**. v.150, n. 104427, 2019.

CTC - Centro de Tecnologia Canavieira. Disponível em: <https://ctc.com.br/>. Acesso em: 26 jun. 2024.

CUNHA, J. T. ET AL. Engineered Saccharomyces cerevisiae for lignocellulosic valorization: a review and perspectives on bioethanol production. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 883-903, 2020.

DA SILVA, G. T; CHIARELLO, L. M; LIMA, E. M; RAMOS, L. P. Sono-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for cellulosic ethanol production. **Catalysis Today**, v. 269, p. 21-28, 2016.

DE MOURA, M. G. G; DA SILVA, T. A; FILHO, A. Z; CORAZZA, M. L; RAMOS, L. P. Fed-batch Enzymatic Hydrolysis of Steam-exploded Sugarcane Bagasse. **BioResources**, v. 18, n. 2, p. 3160-3177, 2023.

DE SOUZA BARBOSA, G. V; GUERRA, S. P. S; DENADAI, M. S; SAAD, A. L. M; SPADIM, E. R; COSTA, M. X. R. Energy cane breeding. **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**, v. 13, p. 103–116, 2020.

DENG, Z; LIAO, Q; XIO, A; HUANG, Y; ZHU, X; QIU, S; ZHU, X. A bio-inspired flexible squeezing reactor for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioenergy production. **Renewable Energy**, v. 191, p. 92-100, 2023.

DIMOS, K; PASCHOS, T; LOULOUDI, A; KALOGIANNIS, K. G; LAPPAS, A. A; PAPAYANNAKOS, N; KEKOS, D; MAMMA, D. Effect of various pretreatment methods on bioethanol production from cotton stalks. **Fermentation**, v. 5, n. 1, p. 5, 2019.

DIONÍSIO, S. R; SANTORO, D. C. J; BONAN, C. I. D. G; SOARES, L. B; BIAZI, L. E; RABELO, S. C; IENCZAK, J. Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse. **Fuel**, v. 304, p. 121290, 2021.

DU, J; ZHANG, F; LI, Y; ZHANG, H; LIANG, J; ZHENG, H; HUANG, H. Enzymatic liquefaction and saccharification of pretreated corn stover at high-solids concentrations

in a horizontal rotating bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 173-181, 2014.

DUQUE, A; MANZANARES, P; BALLESTEROS, I; BALLESTEROS, M. Steam Explosion as Lignocellulosic Biomass Pretreatment. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**, v. 205, p. 349–368, 2016.

EIA – U. S. Energy Information Administration (2024). Disponível em: <https://www.eia.gov/dnav/pet/hist/LeafHandler.ashx?n=PET&s=RBRTE&f=M>. Acesso em 09 de dez. 2024.

European Comission (2018). **Directive (EU) 2018/2001 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on the promotion of the use of energy from renewable sources**. Disponível em:<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2018.328.01.0082.01.ENG&toc=OJ:L:2018:328:TOC>. Acesso em 10 de jan. 2025.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2025). Disponível em:<www.infoteca.cnptia.embrapa.br>. CITE04. Acesso em: 16 de jan. 2025.

FAPESP. **Brasil deve redimensionar sua matriz energética para atingir metas climáticas**. Disponível em: <https://agencia.fapesp.br/brasil-deve-redimensionar-sua-matriz-energetica-para-atingir-metas-climaticas/21964>. Acesso em: 17 jun. 2024.

FENGEL, D; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Ed. New York, NY, USA: Walter de Gruyter, 1989.

FOCKINK, D. H; SÁNCHEZ, J. H; RAMOS, L. P. Comprehensive analysis of sugarcane bagasse steam explosion using autocatalysis and dilute acid hydrolysis (H3PO4 and H2SO4) at equivalent combined severity factors. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 563-572, 2018.

FONTES, A. M; PIRIH, C; TANOBE, G. R. O. A; TARRÉS, Q; DELGADO-AGUILAR, M; RAMOS, L. P. Micro/Nanostructured Lignonanocellulose Obtained from Steam-Exploded Sugarcane Bagasse. **Cellulose**, v. 28, n. 16, p. 10163-10182, 2021.

GÍRIO, F. M; FONSECA, C; CARVALHEIRO, F; DUARTE, L. C; MARQUES, S; LUKASIK, R. B. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4775-4800, 2010.

GRANBIO (2025). Disponível em:<http://www.granbio.com.br/>. Acesso em 15 de jan. 2025.

GRASSI, M. C. B.; PEREIRA, G. A. G. Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 201-205, 2019.

GRASSI, M. C. B.; PEREIRA, G. A. G. Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 201-205, 2019.

GUO, H.; CHANG, Y.; LEE, D. J. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses. **Bioresource Technology**, v. 252, p. 198–215, 2018.

GUO, H; ZHAO, Y; CHANG, J. S; LEE, D. J. Enzymes and enzymatic mechanisms in enzymatic degradation of lignocellulosic biomass: A mini-review. **Bioresource Technology**, v. 367, p. 128252, 2023.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550–567, 2015.

GÜTSCH, J. S.; NOUSIAINEN, T.; SIXTA, H. Comparative evaluation of autohydrolysis and acid-catalyzed hydrolysis of Eucalyptus globulus wood. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 77–85, 2012. HERNANDES, T.A.D; DUFT, D.G; DOS SANTOS, A; LUCIANO, A.C; LEAL, M.R.L.V; CAVALETT, O. Identifying suitable areas for expanding sugarcane ethanol production in Brazil under conservation of environmentally relevant habitats. **J. Clean**. Prod. 292, 125318. 2021.

HOANG, A. T; NGUYEN, X. P; DUONG, X. Q; AGBULUT, U; LEN, C; NGUYEN, P. Q. P; KCHAOU, M; CHEN, W. H. Steam explosion as sustainable biomass pretreatment technique for biofuel production: Characteristics and challenges. **Bioresource Technology**, v. 385, p. 129398, 2023.

HON, D. N. S; SHIRAISHI, N. **Wood and Cellulosic Chemistry**. Ed. New York, NY, USA: Marcel Dekker, 2001.

HUANG, H; GUO, X; LI, D; LIU, M; WU, J; REN, H. Identification of crucial yeast inhibitors in bioethanol and improvement of fermentation at high pH and high total solids. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 16, p. 7486- 7493, 2011.

IEA (2024). Tracking Clean Energy Progress 2023, IEA, Paris https://www.iea.org/reports/tracking-clean-energy-progress-2023, Licença: CC BY 4.0

ISHIZAKI, H.; HASUMI, K. Ethanol Production from Biomass. **Research Approaches to Sustainable Biomass Systems**, v. 111, p. 243–258, 2014.

IUBMB.ORG. Disponível em: <https://iubmb.org/>. Acesso em 24 de jul. 2024.

JORNAL DA UNICAMP (2019). **Enzima modificada pode aumentar a produção de**

etanol de segunda geração. Disponível em: <https://www.unicamp.br/unicamp/ju/noticias/2019/04/09/enzima-modificada-pode-aumentar-producao-de-etanol-de-segundageracao>. Acesso em 03 de jan. 2025.

JOHANSSON, M. B. Biomass, decomposition and nutrient release of *Vaccinium myrtillus* leaf litter in four forest stands, **Scandinavian Journal of Forest Research**, 8:1-4, 466-479. 1993.

KHAN, N; SUDHAKAR, K; MAMAT, R. Role of Biofuels in Energy Transition, Green Economy and Carbon Neutrality. **Sustainability.** 2021.

KORDALA, N.; LEWANDOWSKA, M.; BEDNARSKI, W. Effect of the method for the elimination of inhibitors present in Miscanthus giganteus hydrolysates on ethanol production effectiveness. **Biomass Conversion and Biorefinery**,v. 2, p. 1-9, 2021.

LI, K; MEHMOOD, M.A; ZHAO, X.Q; LIU, C.G; BAI, F.W. Extracellular redox potential regulation improves yeast tolerance to furfural. **Chem. Eng. Sci.** 196, 54–63, 2019.

LI, K; MEHMOOD, M.A; ZHAO, X.Q; LIU, C.G; BAI, F.W. Extracellular redox potential regulation improves yeast tolerance to furfural. **Chem. Eng. Sci.** 196, 54–63, 2019.

LI, X; LI, M; PU, Y; RAGAUSKAS, A; KLETT, A. S; THIES, M; ZHENG, Y. Inhibitory effects of lignin on enzymatic hydrolysis: The role of lignin chemistry and molecular weight. **Renewable Energy**, v. 123, p. 664-674, 2018.

LIU, C. G; XIAO, Y; XIA, X. X; ZHAO, X. Q; PENG, L; SRINOPHAKUN, P; BAI, F. W. Cellulosic ethanol production: Progress, challenges and strategies for solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 3, p. 491–504, 1 maio 2019.

LIU, Y; CHEN, H; WANG, Z. Integrated pretreatment process to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. ***Biomass and Bioenergy*****,** v. 144, p. 105877, 2021.

LUONG, J. H. T. Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Ferment at ion. [s.d.].

LUDWIG, D; MICHAEL, B; HIRTH, T; RUPP, S; ZIBEK, S. High solids enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic materials with a powerful stirrer concept. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 1699- 1713, 2014.

LNBR - Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) (2025). Disponível em:< https://lnbr.cnpem.br/>. Acesso em 10 de jan. 2025.

LORENZI, B. R., ANDRADE, T. H. N. O Etanol de Segunda Geração no Brasil: Políticas e Redes Sociotécnicas. **Ver. Bras. Ci. Soc**. V. 34, p. 100, 2019.

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. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 467–475, 2002.

MADEIRA JUNIOR, J. V. Agro-Industrial Residues and Microbial Enzymes: An Overview on the Eco-Friendly Bioconversion into High Value-Added Products. In: BRAHMACHARI, Goutam; DEMAIN, Arnold L.; ADRIO, José L. (Ed.).

Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications. 2017. p. 475-500.

MAIA, F. L. **Caracterização de variedades de cana-energia e seu potencial de produção de etanol de segunda geração**. 2023. 105 f. Dissertação (Mestrado em ENGENHARIA QUÍMICA) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2023.

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

MEIGHAN, B. N; LIMA, B. N; CARDOSO, D. R. S; BAETA, W. J; ADARME, B. E. L. H; SANTUCCI, O. F; PIMENTA, B. S; AQUINO, M. T. B; GURGEL, S. F; ALVES, L. V. Two-stage fractionation of sugarcane bagasse by autohydrolysis and glycerol organosolv delignification in a lignocellulosic biorefinery concept. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 431–441, 2017.

MELO, N. R. **Etanol 2G: Processo Produtivo e seu Contexto Atual no Brasil**. Monografia de graduação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para a aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do curso de Engenharia Química. 2020. Disponível em:< https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/31885/1/Etanol2GProcesso.pdf>. Acesso em 10 de jan. 2025.

MOHANTY, S. K.; SWAIN, M. R. Bioethanol Production From Corn and Wheat: Food, Fuel, and Future. **Bioethanol Production from Food Crops**, p. 45–59, 2019.

NDC (2021). **Brazil's Nationally Determined Contribution**. Disponível em: <www.unfccc.int/sites/NDCStaging/Pages/Party.aspx?party=BRA>. Acesso em 19 de dez. 2024.

NDUBUISI, I. A; AMADI, C. O; NWAGU, T. N; MURATA, T; OGBANNA, J. C. Non-conventional yeast strains: Unexploited resources for effective commercialization of second-generation bioethanol. **Biotechnology Advances**, v. 387, p. 108100, 2023.

NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor: Efeito do teor de extrativos, catálise

ácida e diferentes tecnologias de fermentação. **Tecnologia de biorecursos**, v. 208, p. 184-194, 2016.

OECD/IEA (2017). **Technology Roadmap Delivering Sustainable Bioenergy**. Disponível em:<https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/Technology_Roadmap_Delivering_Sustainable_Bioenergy.pdf>. Acesso em 09 de jan. 2025.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312–331, 1996.

OVEREND, R. P; CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences**, v. 321, n. 1561, p. 523-536, 1987.

PAN, L; MINGXIONG, H; BO, W; YANWEI, W; GUOQUAN, H; KEDONG, M. Simultaneous concentration and detoxification of lignocellulosic hydrolysates by novel membrane filtration system for bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, v. 227, p. 1185-1194, 2019.

PARISUTHAM, V.; KIM, T. H.; LEE, S. K. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 431- 440, 2014.

PARISUTHAM, V.; KIM, T. H.; LEE, S. K. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 431–440, 2014.

PARISUTHAM, V.; KIM, T. H.; LEE, S. K. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 431–440, 2014.

PASQUAL, J. C; BOLLMANN, H. A; SCOTT, C. A; EDWIGES, T; BAPTISTA, T. C. Assessment of Collective Production of Biomethane from Livestock Waste for Urban Transportation Mobility in Brazil and the United States. **Energies**, v. 11, n. 4, p. 997, 2018.

PINELO, M.; JONSSON, G.; MEYER, A. S. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: molecular and operational features affecting performance. **Separation and Purification Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-11, 2009.

PINO, M. S; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M; MICHELLIN, M; FLORES-GALLEGOS, A. C; MORALES-RODRIGUEZ, R; TEIXEIRA, J. A; RUIZ, H. A. Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. **Chemical Engineering**

Journal, v. 347, p. 119-136, 2018.

PIRICH, C. L; PICHETH, G; FONTES, A. M; DELGADO-AGUILAR, M; RAMOS, L. P. Disruptive enzyme-based strategies to isolate nanocelluloses: A review. **Cellulose**, v. 27, n. 10, p. 5457-5475, 2020.

PITARELO, A. P; FONSECA, S. C; CHIARELLO, L. M; GÍRIO, F. M; RAMOS, L. P. Ethanol production from sugarcane bagasse using phosphoric aciD-catalyzed steam explosion. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 1889- 1898, 2016.

PULIGUNDLA, P; OH, S.E; MOK, C. Microwave-assisted pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass to sugars and ethanol: A review. **Carbon Letters**. v.17, p. 1-10, 2016.

PROJETO SUCRE (2020). **Relatório Final 2020**. Disponível em:<https://lnbr.cnpem.br/wp-content/uploads/2020/07/SUCRE-Project-Final-Report.pdf>. Acesso em 12 de jan. 2025.

QASEEM, M. F.; SHAHEEN, Humaira; WU, Ai-Min. Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**,
v. 144, p. 110996, 2021.

QIN, L; LI, LI, W. C; ZHU, J. Q; LI, X; LI, B. Z; YUAN, Y. J. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2016.

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BOERJAN, W. Lignin structure and its engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 240–249, 2019.

RAÍZEN (2025). Disponível em:< https://www.raizen.com.br/>. Acesso em 15 de jan. 2025.

RAMOS, J. L; VALDIVIA, M; GARCÍA-LORENTE, F; SEGURA. A. Benefits and perspectives on the use of biofuels. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 436– 440, 2016.

RAMOS, L. P. SUOTA, M. J; FOCKINK, D. H; PAVANELLI, G; SILVA, T. A; LUKASIK, R. M. Enzymes and biomass pretreatment. In: **Recent Advances in Bioconversion of Lignocellulose to Biofuels and Value-Added Chemicals within the Biorefinery Concept**. Elsevier, 2020. p. 61-100.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

RAMOS, L. P., Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. Centro de **Pesquisa em Química Aplicada**, p. 11, 2000.

RAMOS, L. P.; SUOTA, M. J.; PAVANELI, G.; CORAZZA, M. L. The role of biomass pre-

treatment for sustainable biorefineries. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 51, p. 62- 68, 2019.

RAMOS, L. P; SILVEIRA, M. H. L; CHIARELLO, L. M; GOMES, G. R; CORDEIRO, C. S. Perspectivas à implementação de projetos de biorrefinaria baseadas no uso de materiais lignocelulósicos. **Panorama de la Industria de celulosa y papel y materiales lignocelulósicos**, 2016 p. 84.

RAMOS, L. P; MAIA, L. F; ANDREATTA CALLEGARI, M. Z; DA SILVA, T. A; BRESSIANI, J; ZANDONÁ FILHO, A. Cellulosic ethanol production using five commercial varieties of energycane. **Industrial Crops and Products**, v. 244, p. 120403, 2025.

RECH, F. R; FONTANA, R. C; ROSA, C. A; CAMASSOLA, M; AYUB, M. A. Z; DILON, A. J. P. Fermentation of hexoses and pentoses from sugarcane bagasse hydrolysates into ethanol by Spathaspora hagerdaliae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, p. 83-92, 2019.

RESCH, M. G.; BAKER, J. O.; DECKER, S. R. Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass Technical Report: NREL/TP-5100-63351, **National Renewable Energy Laboratory**, 2015.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A. M. S.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for etanol production. **Biomass and Bioenergy**, 35, 663-670, 2011.

RUIZ, H. A; CONRAD, M; SUN, S. N; SANCHEZ, A; ROCHA, G. J. M; ROMANÍ, A; CASTRO, E; TORRES, A; RODRÍGUEZ-JASSO; R. M; ANDRADE, L. P;

SMIRNOVA, I; SUN, R. C; MEYER, A. S. Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122685, 2020.

RUIZ, H. A; GALBE, M; GARROTE, G; RAMIREZ-GUTIERREZ, D. M; XIMENES, E; SUN, S. N; LACHOS-PEREZ, D; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M; SUN, R. C; YANG,

B; LADISCH, M. R. Severity factor kinetic model as a strategic parameter of hydrothermal processing (steam explosion and liquid hot water) for biomass fractionation under biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 342, p. 125961, 2021.

SAINI, J. K; HEMANSI. Enhanced cellulosic ethanol production via fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of sequential dilute acid-alkali pretreated sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 372, p. 128671, 2023.

SANTOS, R. V; EVANGELISTA, A. R; PINTO, J. C; FILHO, C. C. C. C; SOUZA. R. M. Composição química da cana-de-açucar (Saccharum SPP.) E das silagens com

diferentes aditivos em duas idades de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1184–1189, 2006.

SCARPA, P. J. C; MARQUES, N. P; MONTEIRO, D. A; MARTINS, G. M; PAULA, A. V; BOSCOLO, M; DA SILVA, R; GOMES, E; ALONSO BOCCHINI, D. Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from Pycnoporus sanguineus MCA 16 and cellulosic ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 141, p. 111795, 2019.

SIERRA, R; SMITH, A; GRANDA, C. HOLTZAPPLE, M.T. 2008. Producing fuels and chemicals from lignocellulosic biomass. **Chemical Engineering Process**, 104, 10.

SILVA, L. G. **Produção de novos materiais a partir da lignina de bagaço de cana-de-açúcar e kraft**. 2014. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2014.

SILVA, V. L; FRITAS, P. V. D. X; CAETANO, G. A. O; FRANÇA, A. F. S. Cana energia e produção de silagem como estratégia para alimentação animal. **Veterinária e Zootecnia**, v. 27, p. 1-13, 2020.

SILVEIRA, M. H. L; MORAIS, A. R. C; DA COSTA, A. M. L; OLEKSZYSZEN, D. N; BOGEL-LUKASIK, R; ANDREAUS, J; RAMOS, L. P. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol & biorefineries. **Chem Sus Chem**. v. 8, p.3366-3390, 2015.

SLUITER, A; HAMES, B; HYMAN, D; PAYNE, C; RUIZ, R; SCARLATA, C; SLUITER, J; TEMPLETON, D; WOLFE, J. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples – Technical Report: NREL/TP-510-42621, **National Renewable Energy Laboratory**, 2008b.

SLUITER, A; HAMES, B; RUIZ, R; SCARLATA, C; SLUITER, J; TEMPLETON, D. Determination of Ash in Biomass – Technical Report: NREL/TP-510-42622, National Renewable Energy Laboratory, 2008c.

SLUITER, A; HAMES, B; RUIZ, R; SCARLATA, C; SLUITER, J; TEMPLETON, D; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Technical Report: NREL/TP-510-42618, **National Renewable Energy Laboratory**, 2008d.

SLUITER, A; HAMES, B; RUIZ, R; SCARLATA, C; SLUITER, J; TEMPLETON, D. Determination of Sugars, Byproducts in Liquid Fraction Process Samples – Technical Report: NREL/TP-510-42623, **National Renewable Energy Laboratory**, 2008e.

SLUITER, A; RUIZ, R; SCARLATA, C; SLUITER, J; TEMPLETON, D. Determination of

Extractives in Biomass – Technical Report: NREL/TP-510-42619, **National Renewable Energy Laboratory**, 2008a.

SUN, C; MENG, X; SUN, F; ZHANG, J; TU, M; CHANG, J. S; REUNGSANG, A; XIA, A; RAGAUSKAS, A. J. Advances and perspectives on mass transfer and enzymatic hydrolysis in the enzyme-mediated lignocellulosic biorefinery: A review. **Biotechnology Advances**, p. 108059, 2022.

SUN, J. SUN, X. F; SUN, R. S; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p.195-204, 2004.

SUOTA, M. J; KOCHEPKA, D. M; GANTER, M. G; PIRICH, C. L; MATOS, M; MAGALHÃES, W. L. E; RAMOS, L. P. Lignin Functionalization Strategies and the Potential Applications of Its Derivatives-A Review. **BioResources**, v. 16, n. 3, 2021.

SZCZERBOWSKI, D.; PITARELO, A. P.; FILHO ZANTONÁ, A.; RAMOS, L. P. Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v.114, p. 95-101, 2014.

TARASOV, D; LEITCH, M; FATEHI, P. Lignin–carbohydrate complexes: properties, applications, analyses, and methods of extraction: a review. **Biotechnol Biofuels**, v. 11, n. 269, 2021.

TAHERZADEH, M. J; KARIMI, K. Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects. In: Biofuels – Alternative Feedstocks and Conversion Processes. **Academic Press**, pp. 287–311, 2011.

TEW, T. L.; COBILL, R. M. Genetic Improvement of Sugarcane (Saccharum spp.) as an Energy Crop. **Genetic Improvement of Bioenergy Crops**, p. 273–294, 2008.

TRADE COMMISSION, F. 2023 Report on Ethanol Market Concentration. [s.d.]. VELASQUEZ-ORTA, S. B; MOHIUDDIN, O; LEDESMA, M. T. O; HARVEY, A. P. Process intensification of microalgal biofuel production. **3rd Generation Biofuels: Disruptive Technologies to Enable Commercial Production**, p. 269–290, 2022.

VIOLANTE, M. H. S. R. **Potencial de Produção de cana-energia em Áreas Agrícolas Marginais no Brasil**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) - FGV. São Paulo, 2012.

WANG, M; HAN, J; DUNN, JB; CAI, H; ELGOWAINY, A. Well-to-wheels energy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn, sugarcane and cellulosic biomass for US use. **Environmental Research Letters**. v. 7, p. 1-13. 2012.

WANG, H; LI, Q., ZHANG, Z; AYEPA, E; XIANG, Q; YU, X; ZHAO, K; ZOU, L; GU, Y; LI, X; CHEN, Q; ZHANG, X; YANG, Y; JIN, X; YIN, H; LIU, Z.L; TANG, T; LIU, B; MA, M. Discovery of new strains for furfural degradation using adaptive laboratory evolution in Saccharomyces cerevisiae. **J. Hazard. Mater**. 459, 132090. 2023.

WANG, Z. C; HOU, X. K; WANG, Y. B; COLLINS, E; DUAN, P. G. Hydrothermal liquefaction of soybean straw: Effect of steam explosion pretreatment and reaction media. **Fuel**, v. 339, p. 127418, 2023.

WEREKO-BROBBY, C; HAGAN, E. B. **Biomass Conversion and Technology**. Chichester [England]; J. Wiley & Sons, 1996.

WYMAN, C; DECKER, S. R; HIMMEL, M. E; BRADY, J. W; SKOPEC, C. E; VIIKARI, L. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. In: **Polysaccharides: Strutural, Diversity and Functional Versatility**. 2005.

XU, C; ZHANG, J; ZHANG, Y; GUO, Y; XU, H; XU, J; WANG, Z. Enhancement of high-solids enzymatic hydrolysis efficiency of alkali pretreated sugarcane bagasse at low cellulase dosage by fed-batch strategy based on optimized accessory enzymes and additives. **Bioresource Technology**, v. 292, 2019.

YANG, S.; DING, W.; CHEN, H. Enzymatic hydrolysis of rice straw in a tubular reactor coupled with UF membrane. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 721-725, 2006. YOUSUF, A.; PIROZZI, D.; SANNINO, F. Fundamentals of lignocellulosic biomass. **Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels**, p. 1–15, 2020.

YU, Y; WU, J; REN, X; LAU, A; RAZAEI, H; TAKADA, M; BI, X; SOKHANSANJ, S. Steam explosion of lignocellulosic biomass for multiple advanced bioenergy processes: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 154, p. 111871, 2022. ZABED, H; SAHU, J. N; BOYCE, A. N; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751–774, 2016.

ZHANG, C; JUN, K. W; GAO, R; KWAK, G; PARK, H. G. Efficient Way of Carbon Dioxide Utilization in a Gas-to-Methanol Process: From Fundamental Research to Industrial Demonstration. **Topics in Catalysis**, v. 61, n. 18–19, p. 1794–1809, 2018.

ZHANG, H; HAN, L; DONG, H. An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 140, p. 110758, 2021.

ZHANG, M; SU, R; LI, Q; QI, W; HE, Z. Enzymatic saccharification of pretreated corn stover in a fed-batch membrane bioreactor. **Bioenergy Research**, v. 4, p. 134-140,

2011.

ZHANG, W; J, A. M; BARONE, J. R; RENNECKAR. Reducing the heterogeneity of xylan through processing. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p.250-258, 2016.

ZHANG, X, LI, Y; SUN, R. Enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by surfactant-assisted pretreatment and process optimization. **Renewable Energy**, v. 184, p. 1012-1022, 2022.

ZHONG, J; YANG, X; WU, Z; LIANG, B; HUANG, Y; ZHANG, T. State of the art and perspectives in heterogeneous catalysis of CO2 hydrogenation to methanol. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 5, p. 1385–1413, 2020.

ZHU, M. Q; WEN, J. L; SU, Y. Q.; WEI, Q; SUN, R. C. Effect of structural changes of lignin during the autohydrolysis and organosolv pretreatment on Eucommia ulmoides Oliver for an effective enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**. V.185. 2015 p.378- 385.

ZIAEI-RAD, Z; FOOLADI, J; PAZOUKI, M; GUMMADI, S. N. Lignocellulosic biomass pre-treatment using low-cost ionic liquid for bioethanol production: An economically viable method for wheat straw fractionation. **Biomass and Bioenergy**, v. 151, p. 106140, 2021.