

Giovanna Lucena

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE 2ª GERAÇÃO A BASE DE  
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR EMPREGANDO O FUNGO *TRICHODERMA REESEI*

Rio de Janeiro

2023

Giovanna Lucena

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE 2ª GERAÇÃO A BASE DE  
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR EMPREGANDO O FUNGO *TRICHODERMA REESEI*

Projeto de Monografia apresentado à Escola  
Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio –  
Fundação Oswaldo Cruz (EPSJV-Fiocruz) como  
requisito parcial para aprovação no Curso Técnico  
em Biotecnologia.

Orientador(a): Dr. Tiago Savignon Cardoso Machado  
Coorientador(a): Dra. Maria De Lourdes Moura Leal

Rio de Janeiro

2023

Giovanna Lucena

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE 2ª GERAÇÃO A BASE DE  
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR EMPREGANDO O FUNGO *TRICHODERMA REESEI*

Projeto de Monografia apresentado como  
requisito parcial para aprovação no Curso Técnico  
em Biotecnologia.

Aprovado em \_\_/\_\_/\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Tiago Savignon Cardoso Machado  
EPSJV/FIOCRUZ

---

Dra. Tainah Silva Galdino de Paula  
EPSJV/FIOCRUZ

---

Ma. Gisele Tortorella dos Santos  
SEEDUC-RJ

Rio de Janeiro  
2023

*Dedico esse trabalho  
Ao meu eu do passado, que não permitiu que um  
evento infortúnio nos definisse.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio – Fundação Oswaldo Cruz (EPSJV-Fiocruz) pelo apoio institucional.

Agradeço aos meus orientadores por me guiarem nessa longa jornada do conhecimento.

Agradeço aos meus pais Alessandra Lucena e Paulo César Lucena por terem me dado todo o apoio emocional e financeiro que podiam ao longo de toda minha caminhada acadêmica.

Agradeço a minha irmã mais velha Fernanda Lucena, por me aconselhar e por ter me ajudado a segurar a barra nos momentos mais difíceis.

Agradeço as minhas melhores amigas Maria Luiza Oliveira e Maria Clara Dias e Julia Terra que me acolheram em todos os momentos de estresse, que me lembram diariamente que a vida não se resume a uma coisa só e que nem por um segundo duvidaram de minha capacidade

Agradeço ao meu melhor amigo de infância e também namorado Pedro Pacheco, por me acolher em todos os dias difíceis, por ser compreensivo com todas as situações, me apoiar em todas as decisões mas também pontuar o que não era certo ou imprudente, por me ajudar em tudo que podia da forma que podia e por sempre me lembrar diariamente em ações o motivo de sermos a “duplinha dinâmica”.

*Belchior- Sujeito  
de sorte  
“Tenho sangrado  
demais, tenho  
chorado para  
cachorro. Ano  
passado eu morri,  
mas esse ano eu  
não morro.”*

## RESUMO

O mercado de combustíveis é comandado pela gasolina, combustível altamente poluente, danoso ao meio ambiente, prejudicial à saúde e de difícil extração. Como opção para reduzir seu uso, existe o etanol, um biocombustível renovável e de fácil produção. O etanol de 1ª geração é produzido no Brasil a partir cana-de-açúcar, onde o caldo é extraído e fermentado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esse processo gera um residual de bagaço de cana, o qual é aproveitado para gerar energia para a própria usina por meio da queima. No entanto, ainda existe um excedente sem utilização podendo causar problemas no ambiente e que pode ser aproveitado como matéria-prima. O percentual de etanol produzido ainda é muito baixo para suprir ou fazer uma diferença significativa na diminuição no uso da gasolina. Portanto, a solução seria aumentar a produção de etanol. Primariamente, pode-se pensar em aumentar a área de plantio, entretanto, essa medida acarretaria mais desmatamentos. Sendo assim, a opção viável seria ressignificar o resíduo gerado na elaboração convencional desse biocombustível. O etanol de segunda geração é produzido a partir do bagaço da cana-de-açúcar e possui um grande potencial energético. Infelizmente, o bagaço é de difícil degradação devido ao material lignocelulósico que o compõe. O *Trichoderma reesei* é um fungo filamentosos de alto potencial para degradação de diversos materiais. Este microrganismo foi descoberto em uma ilha usada pelo exército norte-americano para armazenar equipamentos durante a Segunda Guerra Mundial. Após sua descoberta, o fungo foi isolado em laboratório e geneticamente modificado, onde foram avaliadas diversas cepas e seus respectivos potenciais de degradação para cada material. Este trabalho avalia o potencial do fungo *Trichoderma reesei* na produção de etanol de segunda geração e seu potencial de degradação, além de contemplar os aspectos bioquímicos e industriais da fermentação alcoólica, além de discutir as dificuldades de aplicação na indústria. A metodologia utilizada: quanti-qualitativa, fazendo a revisão bibliográfica de diversos textos científicos.

**Palavras-chave:** *Trichoderma reesei*, etanol 2ª geração, bagaço de cana, biocombustível e hidrólise enzimática

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagem no campo com um grupo de silos .....	14
Figura 2: Estrutura do amido .....	15
Figura 3: Fluxograma referente a primeira e a segunda etapa de produção de etanol obtido a partir do milho .....	16
Figura 4: Representação da parede celular vegetal da cana-de-açúcar composta das estruturas de celulose, hemicelulose, lignina e outros .....	17
Figura 5: <i>Trichoderma reesei</i> .....	19
Figura 6: Diferentes formas de colher cana.....	22
Figura 7: Representação do funcionamento de um hidrociclone .....	24
Figura 8: Fluxograma da primeira etapa de clarificação .....	26
Figura 9: Segunda etapa de clarificação e recuperação do caldo .....	27
Figura 10: Tratamento do caldo em sulfitação com caleação simultânea .....	29
Figura 11: Colunas de destilação de etanol .....	33
Figura 12: Estrutura da celulose.....	42
Figura 13: Estruturas e processos de hidrólise na celulose .....	43
Figura 14: Estrutura química da hemicelulose .....	44
Figura 15: Estrutura química do xilano .....	44
Figura 16: Representação química esquemática na lignina da cana-de-açúcar.....	45
Figura 17: Estrutura da parede celular e estrutura da parede celular pós pré-tratamento .....	46
Figura 18: <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>reesei</i> e <i>atroviride</i> .....	47
Figura 19: <i>Hypocrea jecorina</i> encontrado na natureza.....	48
Figura 20: <i>Aspergillus spp.</i> .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G – Primeira Geração

2G – Segunda Geração

$\alpha$  – Alfa

AFEX – Ammonia fiber expansion ( explosão de fibra de amônia)

ATP – Adenosina Trifosfato

ACE 1 – ativador de celulases

ACE 2 – ativador de celulases 2

$\beta$  – Beta

bar – Unidade de pressão

°C – Grau Celsius

$C_{12}H_{22}O_{11}$  – Sacarose

$Ca(OH)_2$  – Hidróxido de Cálcio

CAZy – Carbohydrate-active enzymes (Enzimas de carboidrato ativas)

CBU – Unidades de celobiase (medida de atividade enzimática)

CEISEbr – Centro Nacional Das Indústrias Do Setor Sucroenergético e Biocombustíveis

CHB – Celobiohidrolase

CO – Monóxido de Carbono

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

CRE 1 – Repressor catabólico de carbono 1

EUA – Estados Unidos da América

GH 1 – Glicosídeo Hidrolase 1

GH 3 – Glicosídeo Hidrolase 3

GH 5 – Glicosídeo Hidrolase 5

GH 6 – Glicosídeo Hidrolase 6

GH 7 – Glicosídeo Hidrolase 7

GH 12 – Glicosídeo Hidrolase 12

GH 45 – Glicosídeo Hidrolase 45

H<sub>2</sub>O – Água

HAP2/3/5 – Proteína ativada por heme 2/3/5

HC – Hidrocarbonetos

HCl – ácido clorídrico

HMF – hidroxil-metil-furfural

HNO<sub>3</sub> – Ácido nítrico

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – ácido fosfórico

KOH – Hidróxido de potássio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico

IBGE – Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística

ITS – Internal Transcribed Spacer ( espaço transcrito interno)

MP – Material Particulado

NADH – Dinucleótico de nicotinamida e adenina

NaOH – Hidróxido de sódio

NCBI – National Center for Biotechnology Information (centro nacional de informação e biotecnologia )

Nox – Óxidos de nitrogênio

pH – Potencial Hidrogênionico

ppm- Partícula por milhão

*S. cerevisae* – *Sacharomyces cerevisae*

Sox – Óxidos de enxôfre

*T. reesei* – *Trichoderma reesei*

USDA – United States Departament Of Agriculture

XYR1 – Fator de transcrição xylanase regulador 1

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1. OBJETIVOS .....	20
1.1.1. OBJETIVO GERAL .....	20
1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>2. METODOLOGIA</b> .....	21
<b>3. CAPÍTULO 1</b> .....	22
3.1. COLHEITA .....	22
3.2. LIMPEZA DA CANA-DE-AÇÚCAR .....	23
3.3. EXTRAÇÃO DO CALDO .....	23
3.4. TRATAMENTOS FÍSICO E QUÍMICO .....	24
3.5. CORREÇÃO DE pH .....	26
3.6. CLARIFICAÇÃO .....	26
3.7. ESTERILIZAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO CALDO .....	28
3.8. FERMENTAÇÃO .....	30
3.9. DESTILAÇÃO .....	32
3.10. DESIDRATAÇÃO .....	33
<b>4. CAPÍTULO 2: ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO E <i>TRICHODERMA REESEI</i></b> .....	33
4.1. ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO .....	33
4.2. PROCESSOS DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO .....	34
4.2.1. PRÉ-TRATAMENTO .....	34
4.2.2. PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO .....	35
4.2.3. PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO .....	36
4.2.4. PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO .....	38
4.3. HIDRÓLISE .....	39
4.3.1. HIDRÓLISE ÁCIDA .....	39
4.3.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	40
4.4. FERMENTAÇÃO .....	41
4.5. COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO .....	42
4.6. <i>TRICHODERMA REESEI</i> .....	46
4.7. COQUETÉIS ENZIMÁTICOS .....	50
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	52

**REFERÊNCIAS.....53**

## 1 INTRODUÇÃO

No mercado de combustíveis temos estabelecido como carro-chefe a gasolina produzida a base de petróleo que é uma excelente matéria prima para a produção de combustíveis e outros derivados, podendo ter várias utilidades e funções. Entretanto, é um combustível fóssil não renovável e de difícil extração, além de ser extremamente danoso ao meio ambiente e ao ser humano, cuja queima libera gases como: monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), óxidos de nitrogênio (Nox), hidrocarbonetos (HC), óxidos de enxofre (SOx), material particulado (MP) etc (NUNES et al., 2014).

Com o agravamento do aquecimento global e suas consequências, a maior discussão de uma agenda ambiental positiva impõe à sociedade a necessidade de substituição dos combustíveis fósseis, alterando a matriz energética para combustíveis oriundos de fontes renováveis. Dentre elas podemos citar: biogás (gases emitidos da decomposição natural de matéria orgânica), biodiesel (produzido a partir de óleos vegetais provenientes da soja e amendoim), e o etanol (que pode ser produzido a base de cana-de-açúcar, beterraba ou milho) (NUNES et al., 2014).

O etanol de primeira geração, que é o bioetanol que conhecemos, é produzido no Brasil a partir do caldo extraído da cana-de-açúcar através da moagem e/ou do melaço. O detalhamento bioquímico será dado no primeiro capítulo desta monografia. O caldo, rico em açúcares como sacarose, é direcionado para produção de etanol ou de açúcar. Essa etapa é onde pode ser executado um mix da produção, em que a usina definirá a quantidade de etanol e açúcar a ser produzido (SILVA, 2013) preponderantemente com base na dinâmica do mercado (lei da oferta e da procura) para a produção de etanol, o caldo da cana-de-açúcar é submetido ao processo de fermentação alcoólica, o qual é realizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Essa etapa dura cerca de oito a doze horas. Este processo dará origem a um vinho de concentração alcoólica variável entre 7% a 10% e as leveduras são recuperadas desta mistura por centrifugação. Após essa etapa, o material é destilado para se obter o etanol hidratado (93,8% etanol e 6,2 % água), que é o etanol utilizado em motores que funcionam especificamente a base da queima de álcool. O etanol hidratado é desidratado para chegarmos ao etanol anidro (99,3% de etanol e 0,7% de água), que é um aditivo para a gasolina o qual aprimora sua octanagem e reduz a emissão de gases poluentes (SILVA, 2013).

Porém, este tipo de bioetanol não é o único. É possível produzir bioetanol a partir de diversos outros materiais, como milho, beterraba etc. O processo de produção de combustíveis a base de milho pode ser realizado com os grãos recém colhidos ou já armazenados em silos

(SILVA 2013). Silos são estruturas geralmente metálicas, muito utilizadas para o armazenamento de grãos, como pode ser observado na figura 1 (CHBAGRO, 2020).

Figura 1: Imagem no campo com um grupo de silos.



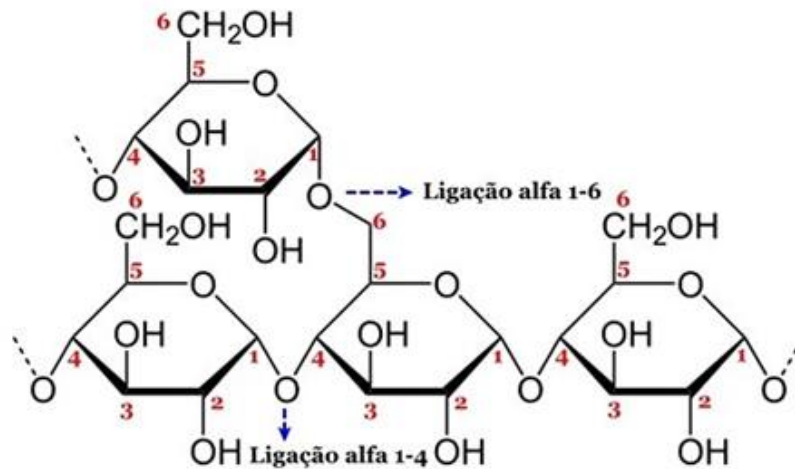
Fonte: CHBAGRO, 2020.

Legenda: Campo com um grupo de silos, equipamento muito utilizado na agricultura para armazenar grãos dentre outras matérias primas.

O grão é triturado, com o objetivo de expor os tecidos de reserva ricos em amido, facilitando a extração dessa biomolécula (LOZANO, 2018).

Essa mistura é então submetida a uma temperatura de 100°C, promovendo assim a gelatinização das moléculas de amido presentes nos grãos, formando uma pasta, a qual facilita a ação das enzimas. As moléculas de amido não são fermenticíveis, ou seja, não é possível produzir o etanol pela ação das leveduras do gênero *S. cerevisiae*, nesse caso é realizado o processo de hidrólise (hidrólise é a quebra de uma ou mais moléculas utilizando moléculas de água) em glicose, maltose, oligossacarídeos, dextrinas etc. Nesse processo é necessária a adição da enzima  $\alpha$ -amilase, a qual é responsável por quebrar as ligações  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 das moléculas de amido em temperaturas de 70°- 90°C. Após esse processo, a pasta de milho é resfriada até 32°C, e o pH é ajustado a 4,5 (LOZANO, 2018). A figura 2 apresenta um trecho da molécula de amilopectina, onde é possível identificar as ligações lineares  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 e as ramificações  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6.

Figura 2: Estrutura do amido.

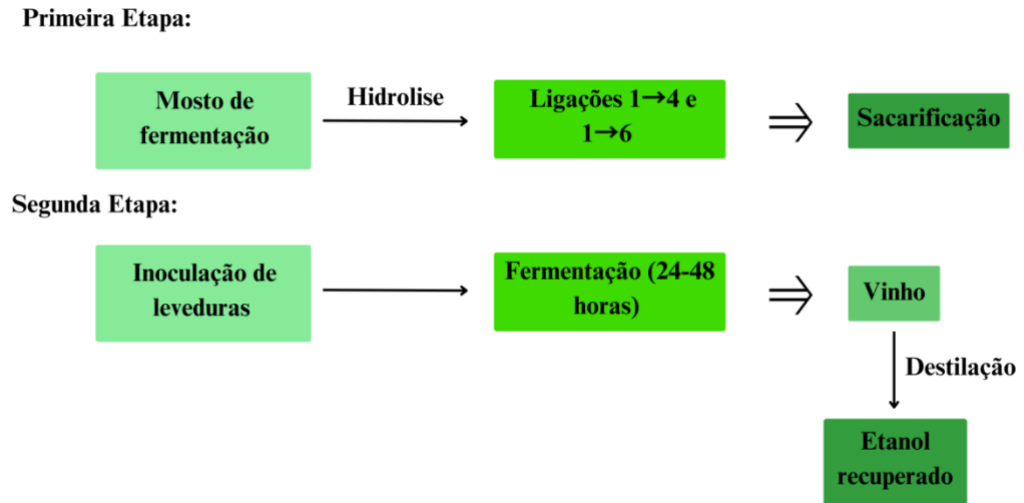


Fonte: DENARDIN et al., 2009.

Legenda: Estrutura do amido que evidencia as ligações  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 e  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6. Os números em vermelho estão representando os carbonos.

Após esse processo é adicionada ao mosto, que nada mais é que o suco em fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* de material sacaríneo, a enzima glucoamilase, a qual é responsável por hidrolizar de forma mais completa as ligações  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 e  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 do amido. Esta etapa é chamada de sacarificação, consiste da hidrólise total das moléculas provenientes da liqueficação em unidades de glicose. Na etapa seguinte, é feita a inoculação de leveduras que darão início ao processo de fermentação. Essa ação ocorrerá entre 24-48 horas. Após ser fermentado, teremos um vinho, o qual é destilado para a recuperação do etanol. Diferente da cana-de-açúcar, não há o processo de recuperação das leveduras (LOZANO, 2018). Na figura 3 está apresentado um diagrama de bloco das duas etapas referentes a fermentação alcoólica do milho.

Figura 3: Fluxograma referente a primeira e a segunda etapa de produção de etanol obtido a partir do milho.



Fonte: Adaptado de LOZANO 2018.

Legenda: Na primeira etapa temos a hidrólise do mosto de fermentação, onde as ligações  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 e  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 serão hidrolisadas o que resultará na sacarificação desse mosto. Já na segunda etapa, ocorre a inoculação das leveduras que depois são fermentadas de 24 a 48 horas. O resultado dessa fermentação é o vinho que é destilado tendo assim a recuperação do etanol.

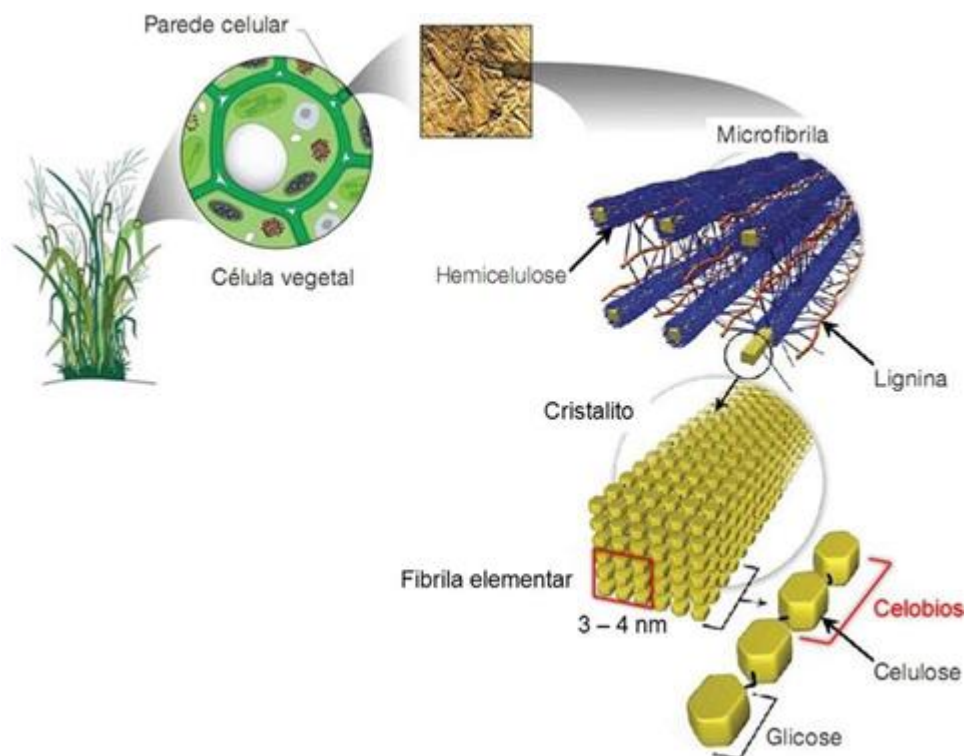
Também é possível produzir o bioetanol feito com beterraba sacarina (popularmente conhecida somente por beterraba), muito comum na França. A beterraba é lavada e fatiada em chips, e desnatada até que obtenha 75% de umidade. Depois, o líquido restante passa por evaporação a fim de concentrar os açúcares, até se tornar um xarope o qual passará por a fermentação contínua empregando a levedura *S. cerevisiae* (TAVARES, 2019; FERREIRA et al., 2015).

Segundo dados do IBGE, em 2021 o Brasil produziu 715.659.212 toneladas de cana-de-açúcar, tendo como maior produtor o estado de São Paulo com 405.000.643 toneladas. O CEISEbr (Centro Nacional das Industrias do Setor Sucroenergético e Biocombustíveis), afirmou em 2019 que os Estados Unidos da América produzem cerca de 35 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, tendo a Flórida como principal produtora. Em 2018 foram produzidos exatos 34.757 milhões de toneladas, sendo o maior número desde 2002. Dados da USDA (U.S. Department of Agriculture), em 2021 os EUA produziram 69 milhões de toneladas de milho, tendo um crescimento médio composto de 7,2% de 2012-2021.

Após a moagem da cana-de-açúcar há uma grande sobra de material, o bagaço. Cerca de dois terços da cana é composta de material lignocelulósico, revelando seu grande potencial para produção energética. A estimativa é de que o aproveitamento do bagaço aumente a

produção de álcool de 30 a 40% (PACHECO, 2011). A parede celular vegetal da cana é formada por 48,6% de celulose, 31,1% hemicelulose, 19,1% lignina e 1,2% de cinzas, podem ser encontradas em menor porção pectinas, lipídeos e proteínas dependendo da origem da biomassa. Os polissacarídeos encontrados na parede celular são heterogêneos e possuem estrutura complexa (DAL'MAS, 2017). Na figura 4 podemos observar a estrutura da parede celular que compõe o bagaço.

Figura 4: Representação da parede celular da cana-de-açúcar composta das estruturas de celulose, hemicelulose, lignina e outros.



Fonte: Adaptado de US DOE 2005.

Legenda: A imagem funciona como um zoom da cana-de-açúcar. Primeiro podemos observar a planta e sua escala regular, em seguida a parede celular e células vegetais que formam a microfibrila, que por sua vez é formada por lignina (linhas vermelhas), hemicelulose (azul) que é responsável por revestir o cristalito, formado pela fibrila elementar, um conjunto de glicoses ligadas a outras glicoses.

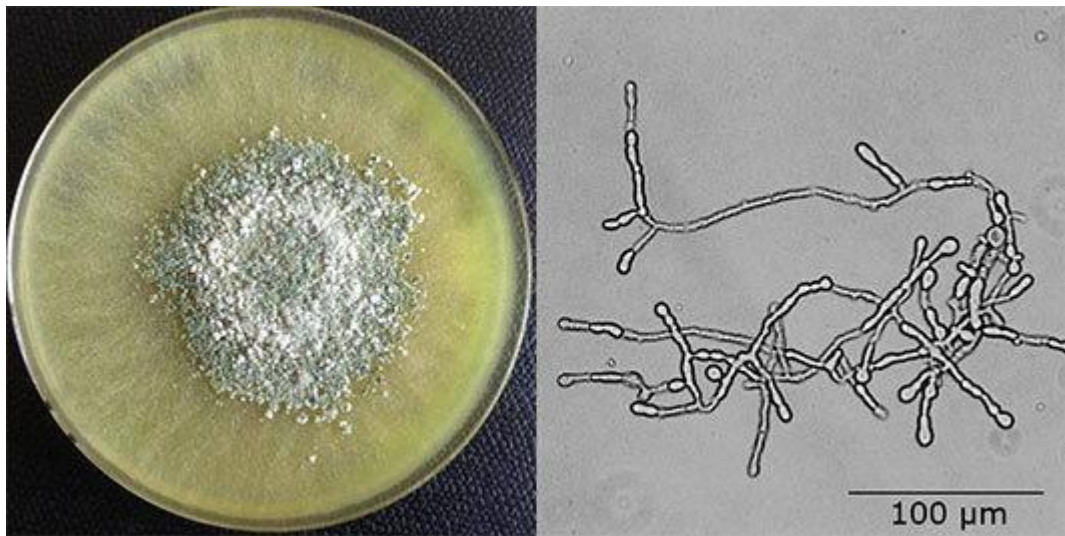
Há diversas pesquisas que estudam a inserção da produção de bioetanol de segunda geração no mercado. Algumas delas sugerem um pré-tratamento que separa a hemicelulose, não destruindo a lignina e a celulose, o que ainda é um grande obstáculo pois requer microorganismos específicos. A etapa de hidrólise da celulose é realizada através da ação de enzimas que produzirão a glicose a qual é fermentada (PACHECO, 2011).

As enzimas possuem estruturas distintas, que necessitam de ações específicas, o que obriga que cada coquetel enzimático seja composto por diferentes enzimas que atendam esses grupos. Um coquetel enzimático é uma mistura de duas ou mais enzimas produzidas por um ou mais microorganismos (EMBRAPA 2020). A grande problemática está no valor dos coquetéis que custam cerca de dois dólares e setenta centavos por galão de biocombustíveis (DAL'MAS, 2017).

Um grande problema relativo ao etanol de 1ª geração (1G) é o resíduo oriundo da sua produção: são necessárias toneladas de cana para se gerar uma quantidade considerável de caldo e, ao final do processo, se tem uma grande quantidade de material residual de bagaço de cana, que atualmente é utilizado para gerar energia elétrica nas próprias usinas de álcool através da queima. Entretanto, é possível dar um novo sentido a esse resíduo orgânico. É imprescindível que esse material seja parcialmente digerido, de forma a liberar açúcares mais simples possíveis de serem fermentados. Neste contexto, podemos aplicar o fungo filamentosso *Trichoderma reesei* (*T. reesei*), que possui um grande potencial de degradações lignocelulolíticas, e que, portanto, seria o responsável pela degradação do bagaço e facilitaria posteriormente o processo de fermentação do etanol. Esse etanol é conhecido como etanol de 2ª geração (2G) (SHIDA; FURUKAWA; OGASAWARA; 2016).

O *T. reesei* é um fungo com diversos filamentos (denominados hifas) e pode ser comumente encontrado em diversos tipos de solo (MATHEUCCI, 1993)

Figura 5: *Trichoderma reesei*



Fonte: VARMA, 2022.

Legenda: Imagem do fungo *Trichoderma reesei* em meio sólido (esquerda) e em microscópio (direita)

Durante a Segunda Guerra Mundial, o fungo *T. reesei* foi isolado pelos pesquisadores do exército norte americano Mary Mandels e Elwyn T. Reese, graças a sua capacidade de degradar diversos materiais, incluindo os celulósicos (BISCHOF et al., 2016). A partir desse isolamento, diversas linhagens modificadas foram produzidas com o objetivo de ser um produto melhor (BUENO, 2018).

O fungo apresenta grande potencial biotecnológico devido a sua capacidade de produzir enzimas, principalmente celulasas e hemicelulasas. Em relação às celulasas, o *T. reesei* é um ótimo aliado da indústria por ser de fácil cultivo e não apresentar riscos ao ser humano, visto que não produz micotoxinas ou qualquer outra substância nociva que possa ser liberada durante seu processo de produção de enzimas celulolíticas. Desde então, vêm sendo produzidos estudos isolando o fungo e submetendo-o a mutações com o objetivo de se adquirir uma alta produção de enzimas celulolíticas, para que assim se tenha uma produção em massa e de baixo custo deste material para a degradação da biomassa celulósica (presente no bagaço da cana) para a produção de etanol (SILVA, 2013).

## **1.1.OBJETIVOS**

### **1.1.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o potencial do fungo filamentosso *Trichoderma reesei* na produção e qualidade dos biocombustíveis de segunda geração produzidos a partir do bagaço da cana-de-açúcar

### **1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Revisar os aspectos bioquímicos e industriais da fermentação alcoólica.
- 2) Descrever o fungo *Trichoderma reesei* e seu potencial para a degradação celulósica do bagaço-da-cana-de-açúcar.

## 2. METODOLOGIA

O presente trabalho teve um caráter exploratório de revisão bibliográfica de artigos, teses, monografias, dissertações e outros textos científicos publicados nos últimos anos, empregando as seguintes palavras-chave “*Trichoderma reesei*, etanol 2ª geração, bagaço de cana, hidrólise enzimática bagaço de cana, biocombustível e meio ambiente”.

Foi baseado na abordagem metodológica quanti-qualitativa utilizando as fontes Scielo, Google Acadêmico, website do MAPA, da EMBRAPA, BDTD, CAPES, IBGE e Repositório da Produção Científica e Intelectual da Unicamp.

### 3. CAPÍTULO 1: DA COLHEITA DA CANA À BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA NA INDÚSTRIA

Neste capítulo será abordado desde o processo de colheita até a produção do etanol, evidenciando etapas importantes que podem afetar o resultado final. O caldo-de-cana é composto majoritariamente de água e sacarose, além de poder conter em sua composição outras substâncias como açúcares redutores e restos de partículas (THIELMANN, 2021).

#### 3.1 A COLHEITA

Para a produção de etanol de 1G, a cana é queimada ainda na lavoura. Esse processo é necessário tanto para colheita de forma manual quanto por máquinas. No primeiro caso a folha da planta pode ferir os trabalhadores (Figura 6 A). (Figura 6 B) e no segundo caso a cana-de-açúcar não madura pode vir a danificar ou diminuir a eficácia do equipamento, além de poder causar danos a terra com o arraste do solo (THIELMANN, 2021).

Figura 6: Diferentes formas de colher cana



Fonte: BRASIL DE FATO, 2016 e REVISTA CULTIVAR, 2016.

Legenda: (A)Trabalhador rural cortando cana-de-açúcar queimada em um canavial. (B)Máquinas fazendo a colheita de cana-de-açúcar em um canavial.

### **3.2. LIMPEZA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

Ao chegar nas usinas, o material é submetido a um processo de limpeza a fim de remover restos de terra, dentre outras impurezas. Essa etapa apresenta desvantagens, pois durante o processo de lavagem com água, há perda de açúcares presentes na cana. Para evitar essa perda, é analisado e pensado o uso de lavagens a seco, utilizando sopradores para remover partículas, dentre outras técnicas. Em seguida, a cana-de-açúcar é cortada, nivelada e esmagada por martelos giratórios, que forçam a passagem da cana em uma placa desfibradora que abrirá as fibras da mesma, facilitando assim a extração dos açúcares (FONSECA, 2014). Em seguida, é utilizado um eletroímã, a fim de remover possíveis partículas metálicas ali presentes (THIELMANN, 2021).

### **3.3. EXTRAÇÃO DO CALDO**

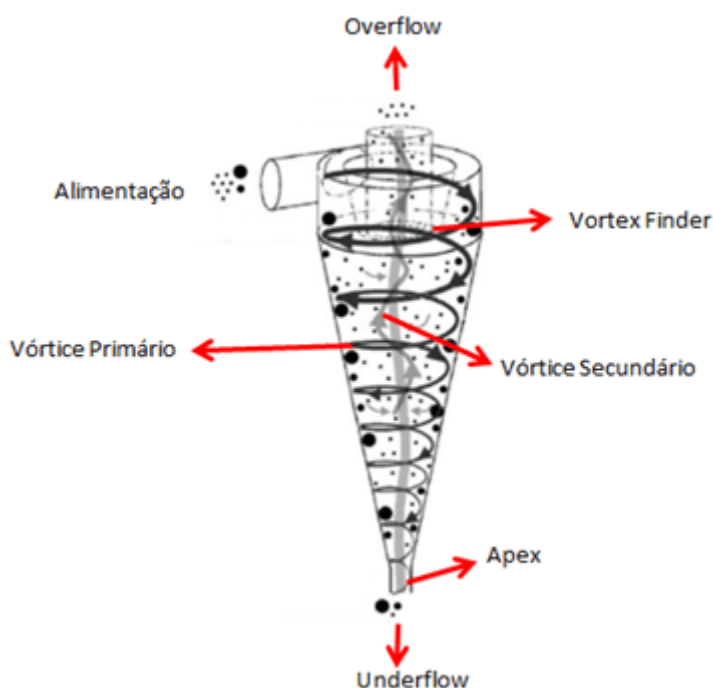
O processo de extração do caldo é feito por meio de moagem, onde a cana é desfibrada e prensada por rolos em movimentos rotatórios horizontais. Durante esse processo, a cana perde muita água, se fazendo necessário umedecer o bagaço com água quente (entre 70° e 80°C) para dissolver os açúcares ainda presentes em abundância e obter mais caldo. A taxa de extração final é bem alta, variando de 95% a 98%. Essa moagem também é pensada para produzir um bagaço seco de rápida combustão para gerar energia e o material apresenta aproximadamente 50% de umidade (FONSECA, 2014).

A extração também pode ser feita por lixiviação: essa técnica exige um preparo mais atencioso em relação à cana, possuindo uma menor contaminação do material e menor custo de energia, além de ter potencial para extração de 99% de sacarose. Sua desvantagem é o alto custo de investimento inicial, o processo de produção mais lento e produz um bagaço muito úmido, ainda que seja mais eficiente na extração dos açúcares (FONSECA, 2014).

### 3.4 TRATAMENTOS FÍSICO E QUÍMICO

Após a extração, o caldo passa por um tratamento físico onde o bagacilho (uma parte muito fina do bagaço), dentre outros compostos sólidos que passam para o caldo, serão removidos pelos hidrociclones (equipamentos utilizados na separação sólido-líquido e líquido-líquido em campo centrífugo) e filtros (FONSECA, 2014). Na figura 8 temos a representação do funcionamento de um hidrociclone.

Figura 7: representação do funcionamento de um hidrociclone.



Fonte: SALVADOR, BARROZO e VIEIRA, 2014.

Legenda: Alimentação: por onde entra o caldo; Overflow: Saída do líquido-líquido; Vortex finder: pequeno vórtex que se encaixa com o vórtex primário; Vórtex primário: fluxo em espiral que leva as partículas presentes no caldo até o apex e underflow (saídas); Vórtex secundário: fluxo em espiral responsável por levar o líquido-líquido até o overflow.

É comum que nessa etapa de separação centrífuga seja levada uma parte do açúcar, e faz-se uma segunda lavagem desse material para recuperação (FONSECA, 2014). Essa etapa é de suma importância, pois essas impurezas, que são insolúveis, devem ser removidas posto que prejudicam a fermentação podendo causar ações inibidoras ou mesmo afetar a recuperação da levedura (ALBARELLI, 2013). Ao estar livre de impurezas não solúveis, o caldo é encaminhado para o processo de tratamento químico (ALBARELLI, 2013).

A etapa de tratamento químico, denominada sulfitação tem o objetivo de inibir as reações de escurecimento do açúcar e auxiliar na clarificação do caldo. Este processo consiste na queima do enxofre para gerar o gás sulfuroso ( $\text{SO}_2$ ) que é então misturado ao caldo. É importante ressaltar que neste processo ocorre uma redução no pH do caldo devido a incorporação do  $\text{SO}_2$  (DIAS, 2008).

Portanto, é necessário que o pH seja corrigido tanto na produção de açúcar, quanto na produção de etanol. Em meio ácido, a sacarose é suscetível a inversão, decomposição e hidrólise, responsável por formar glicose e frutose (açúcares redutores), que são decompostos para HMF (hidroxil-metil-furfural), ácidos orgânicos e gás carbônico. Já em meio alcalino a sacarose se apresenta estável em temperaturas de até 80 °C. Se ultrapassada a temperatura, também ocorrerá a decomposição da sacarose e se obtém a formação de outros compostos como: dioxiacetona, ácido lático, gliceraldeído e outros (DIAS, 2008).

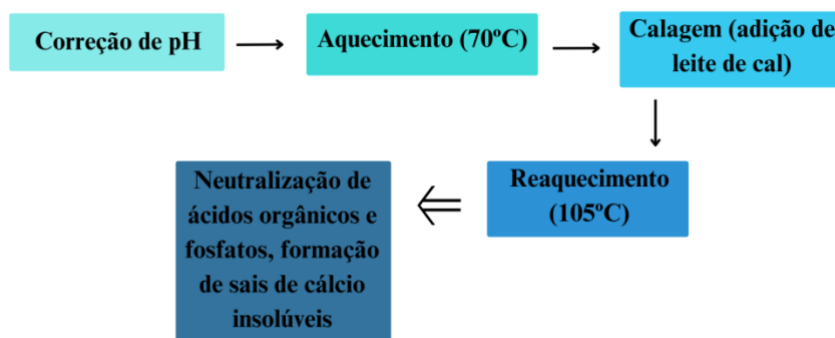
### **3.5. CORREÇÃO DE pH**

Para corrigir o pH, mantendo-o em uma faixa de 7,0-7,2 são adicionados na seguinte ordem: ácido fosfórico, leite de cal (hidróxido de cálcio) e polímero floculante que reagem com os ácidos orgânicos ali presentes fazendo a coagulação e floculação das partículas restantes, que são decantadas e posteriormente removidas. O ácido fosfórico adicionado é calculado com base na quantidade de fosfato já presente no caldo. Tem-se uma concentração total entre 200 e 300 ppm (partes por milhão) (DIAS, 2008).

### **3.6. CLARIFICAÇÃO**

Após a correção de pH o caldo é submetido a calagem, onde é adicionado o hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). O caldo é aquecido a 70 °C, e depois reauecido a 105 °C após a adição de leite de cal. Essa etapa consiste em estimular a neutralização de ácidos orgânicos e fosfatos, que formam um precipitado de sais de cálcio insolúveis após o aquecimento (DIAS, 2008). Na figura 8 está apresentada o fluxograma da primeira etapa de clarificação:

Figura 8: Esquema da primeira etapa de clarificação.



Fonte: Adaptado de DIAS 2008.

Legenda: A imagem esquematiza e simplifica a primeira etapa de clarificação, onde a correção de pH é realizada bem como as etapas de aquecimento, calagem e reaquecimento que resultam na neutralização de ácidos, fosfatos e sais de cálcio insolúveis.

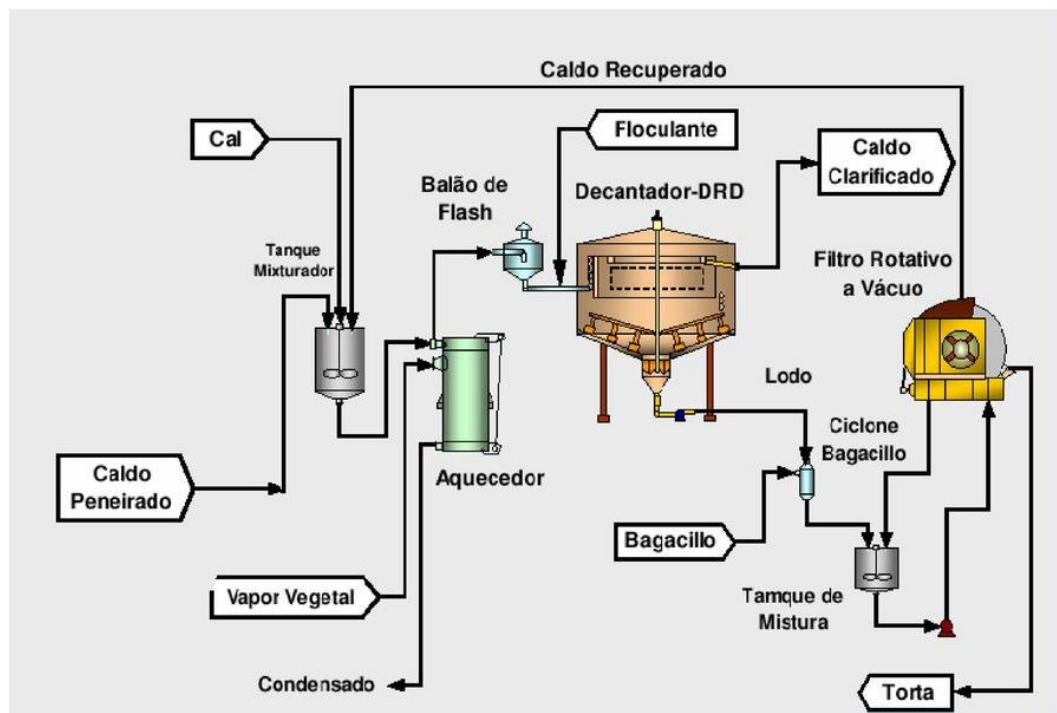
O caldo é aquecido a 105 °C em uma pressão equivalente a 2,5 bar, posteriormente passa por um balão de flash onde ocorre uma redução de pressão para 0,97 bar, que separa parte da água. Após a passagem pelo balão flash, o caldo receberá um polímero floculante, como a poliácridamida de elevada massa molecular, com o objetivo de formar grandes flocos que facilitam e aceleram o processo de clarificação e que diminuem as perdas de sacarose no filtro. Nesse processo, o conteúdo perde entre 7 e 5°C, sendo o controle da temperatura de suma importância, pois uma grande variação para valores abaixo de 98°C pode gerar ações de microrganismos e, por consequência, a perda de açúcares. Essa etapa consiste em remover todo o ar/gases não condensáveis que prejudicariam a etapa de decantação, onde a parte sólida decantada é mandada para um tanque de coagulação. Nesta etapa, 100% dos sólidos são separados e 17% do caldo é transferido junto aos sólidos formando um lodo, o qual passa por filtros rotativos para que o caldo arrastado junto dos sedimentos seja recuperado e volte para o início do processo. Os filtros são alimentados com água de lavagem e bagacilho, que auxiliam na filtragem com a formação de flocos maiores, os quais são facilmente retidos, e o filtrado é devolvido ao caldo após a adição de cal. Esse resíduo é chamado de “torta de filtro” (traduzido do termo em inglês “*filter cake*”), usado como fertilizante em lavouras (DIAS, 2008; ALBARELLI, 2013).

Podemos observar no esquema que exemplifica visualmente todo o processo da clarificação (Figura 9). Primeiro, o caldo peneirado é direcionado ao tanque misturador (misturador, pois faz um mix do caldo que ainda não passou pelo processo com o caldo

recuperado do lodo), onde também é adicionado o cal. O caldo é direcionado a um aquecedor, que recebe vapor vegetal e libera condensado.

Após esse aquecimento o caldo é submetido ao balão de flash e liberado no decantador, onde se é acrescentado o floculante. O produto desse processo é o caldo clarificado, que fica separado na parte superior do decantador, e o lodo, que fica na parte inferior do equipamento e transportado para o ciclone de bagacilho. O ciclone tem o objetivo de extrair qualquer partícula restante presente no lodo e, para facilitar esse processo, é adicionado bagacilho, que se une às partículas menores, as tornando maiores e facilitando sua remoção. Esse material é encaminhado para outro tanque de mistura, passando em seguida pelo filtro rotativo a vácuo, onde o caldo residual extraído do lodo volta para o primeiro tanque mixturador, já o resíduo sólido é o *filter cake* já explicado acima (BAPTISTA, 2023 ADAPTADO)

Figura 9: Segunda etapa de clarificação e recuperação do caldo.



Fonte: BAPTISTA, 2023.

Legenda: A imagem esquematiza todo o processo de recuperação do caldo. Inicialmente, o caldo peneirado é dirigido ao tanque mixturador, onde é misturado com o caldo recuperado do lodo. É aquecido em um dispositivo que recebe vapor vegetal e libera condensado, o caldo passa pelo balão de flash, indo para o decantador, onde é adicionado o floculante. O resultado é o caldo clarificado na parte superior do decantador e o lodo na parte inferior, que é transportado para o ciclone de bagacilho. O ciclone extrai partículas remanescentes no lodo, auxiliado pelo bagacilho, facilitando a remoção. O material resultante passa por um tanque de mistura, seguido por um filtro rotativo a vácuo. O caldo residual volta para o primeiro tanque mixturador, enquanto o resíduo sólido é o "filter cake".

### 3.7 ESTERILIZAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO CALDO

Após esses processos, é iniciada a etapa de concentração e esterilização do caldo (agora clarificado), para que possa ser fermentado, pois uma baixa concentração pode interferir no teor alcoólico do vinho, ficando abaixo do desejável (DIAS, 2008). Para aumentar a concentração, o caldo passa por um sistema de evaporadores de múltiplo efeito, que podem conter 5 ou 6 estágios. Há três tipos de modo de operação que podem ser utilizadas para a concentração do clarificado, sendo elas: Co-corrente (costuma ser o método mais utilizado pelas usinas, onde o caldo e o vapor percorrem em uma mesma direção), contracorrente (clarificado e vapor percorrem em direções contrárias) e mista (DIAS, 2008).

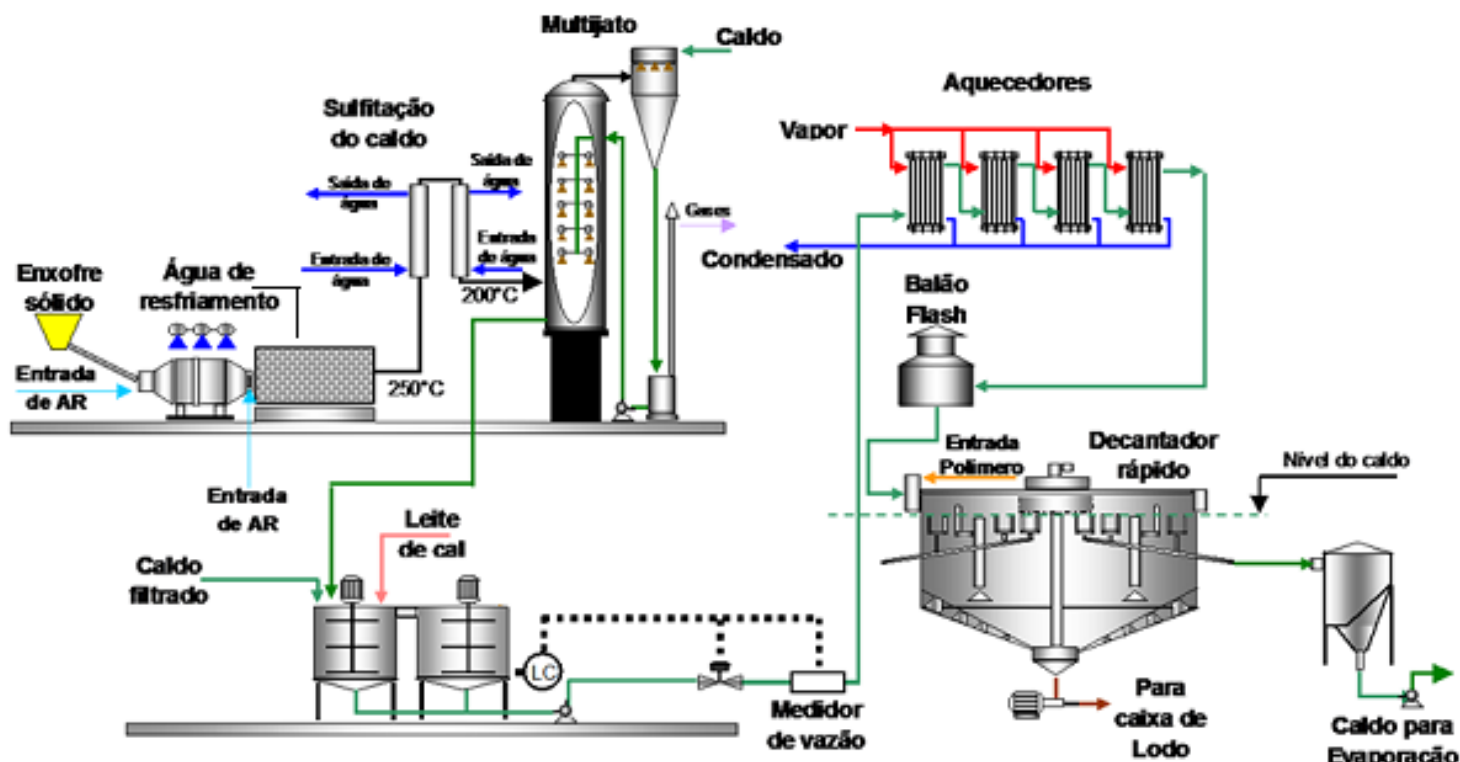
O caldo inteiro não passa pelo processo de concentração: Apenas uma parcela é submetida a essa etapa, que tem como objetivo obter uma concentração final de açúcares no mosto de aproximadamente 22% °Brix (°Brix nada mais é que a porcentagem de sólidos solúveis dissolvidos no caldo bruto da cana. Um *grau Brix* (1°Bx) é igual a 1g de açúcar por 100 g de solução, ou 1% de açúcar), posto que o caldo clarificado possui um °Brix equivalente a 15. É comum utilizar parte da concentração do caldo em até 65% °Brix, o qual é adicionado juntamente ao caldo clarificado para que seja esterilizado (DIAS, 2008; ALBARELLI, 2013).

Para a esterilização do caldo concentrado, é feito um tratamento denominado “alta temperatura em curto tempo” (tradução literal para o termo em inglês “*High temperature short time*”). Nesse processo, o caldo é aquecido a vapor e mantido a 130 °C por 30 minutos, e em seguida passa por um rápido resfriamento até que se atinja a temperatura ideal para a fermentação (por volta de 32°C). Esse processo de resfriamento pode ser feito por trocadores de placas regenerativos seguido de resfriamento com água (DIAS, 2008). Há um grande controle para que esses processos não atinjam uma pressão superior a atmosférica, pois com uma pressão muito elevada se tem por consequência um aumento de temperatura, o que diminui a qualidade dos açúcares presentes no caldo os quais serão posteriormente fermentados (ALBARELLI, 2013).

O caldo, agora clarificado e esterilizado, pode ser enviado para a etapa de produção de etanol. É necessário que tenha uma concentração em °Brix de 19% a 22%, considerado ideal para o processo de fermentação alcoólica. Caso o caldo tenha concentração inferior ao desejável é adicionado o melaço oriundo da produção de açúcar. Caso a concentração do caldo seja superior a desejável adiciona-se água. Posteriormente a mistura passa por um evaporador simples, muito utilizado para substâncias de baixa viscosidade (ALBARELLI, 2013). Na figura

10 podemos contemplar todas as etapas de tratamento do caldo antes da fermentação, incluindo os processos de caleação e sulfitação.

Figura 10: Tratamento do caldo sulfitação com caleação simultânea



Fonte: FARIAS. J.W, 2019 (<https://pt.linkedin.com/pulse/sulfita%C3%A7%C3%A3o-com-calea%C3%A7%C3%A3o-simult%C3%A2nea-jos%C3%A9-welligton-farias> )

Legenda: Na imagem podemos observar todas as etapas de tratamento do caldo, onde a parte superior esquerda se observa o tratamento de sulfitação do caldo, inferior esquerda a caleação, superior e inferior direito as etapas de clarificação e recuperação do caldo.

### 3.8. FERMENTAÇÃO

A etapa de fermentação é a mais importante de todo o processo, pois é nessa etapa em que ocorre a produção do etanol. Esse biocombustível é obtido pela ação de enzimas encontradas em microrganismos sobre os açúcares presentes no caldo de cana. Dentre os microrganismos produtores de etanol, as leveduras, e mais especificamente, *Saccharomyces cerevisiae* convertem a sacarose em etanol com elevado rendimento próximo do teórico. A sacarose é um dissacarídeo e, para que possa ser prontamente consumido pela levedura, é necessário que seja hidrolisado. A levedura *S. cerevisiae* possui a enzima denominada invertase, responsável pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose que posteriormente são convertidos em álcool e CO<sub>2</sub> com liberação de energia térmica (LIMA, 2019). As duas fases de produção de etanol podem ser observadas nas reações estequiométricas abaixo:



piruvato são produzidas dentro do citoplasma da célula (OLIVEIRA, 2020). No total são doze reações em sequência para transformação de açúcar em etanol. Paralelamente ao etanol, principal produto, são formadas e excretadas substâncias como glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, aldeído acético entre outros de menor proporção, além da biomassa (crescimento da levedura) (LIMA, 2019).

Fatores físicos, químicos e microbianos influenciam no máximo desempenho da fermentação alcoólica. A levedura *S. cerevisiae* é um microrganismo mesófilo, portanto a temperatura ideal para produção de etanol está na faixa de 26°C a 35°C. Com relação aos valores de pH, os mais adequados se encontram no intervalo de 4,5 a 5,5. No que tange às exigências nutricionais, as leveduras são organismos quimioheterotróficos, ou seja, necessitam de uma fonte de carbono (carboidratos) que forneça energia e carbono para sua estrutura constitucional, além de vitaminas, nitrogênio, fósforo, enxofre entre outros minerais. Geralmente, o caldo de cana puro não possui todos os nutrientes para o crescimento da levedura, portanto sendo necessária a correção cuidadosa daqueles componentes que estão em concentração insuficiente para o bom desempenho da fermentação alcoólica. Portanto, a utilização de um meio com composição adequada e condições de cultivo ótimas reduzem a formação de produtos secundários e acarretam no máximo rendimento em etanol (LIMA, 2019).

Essa etapa gera um vinho com teor alcoólico próximo a 7 e 10% em massa (em massa significa quer dizer a relação massa da solução e massa do soluto, nesse caso a massa do etanol em relação ao solvente). Para a obtenção do etanol anidro, a solução passa por uma série diversa de etapas de separação. Na primeira etapa pode se obter um etanol concentrado de até 93% em massa, sendo este o etanol hidratado. Essa mistura água-etanol ainda possui uma grande parcela de água formando um azeótropo (mistura de duas ou mais substâncias que possuem um ponto de ebulição constante e fixo como uma substância pura, ainda que não seja), possuindo 95,6% em massa (equivalente a 89% de etanol) e 11% de água, sendo assim necessária submissão a um processo de destilação não simples para que se atinja o etanol anidro superior a 99% em massa, garantindo assim que o álcool produzido esteja dentro das especificações para utilização como álcool etílico hidratado carburante (ALBARELLI, 2013; DIAS, 2008).

Existem diversos processos para a produção de álcool anidro na indústria, sendo adsorção em peneiras moleculares e a destilação azeotrópica e heterogêneo as mais utilizadas (DIAS, 2008).

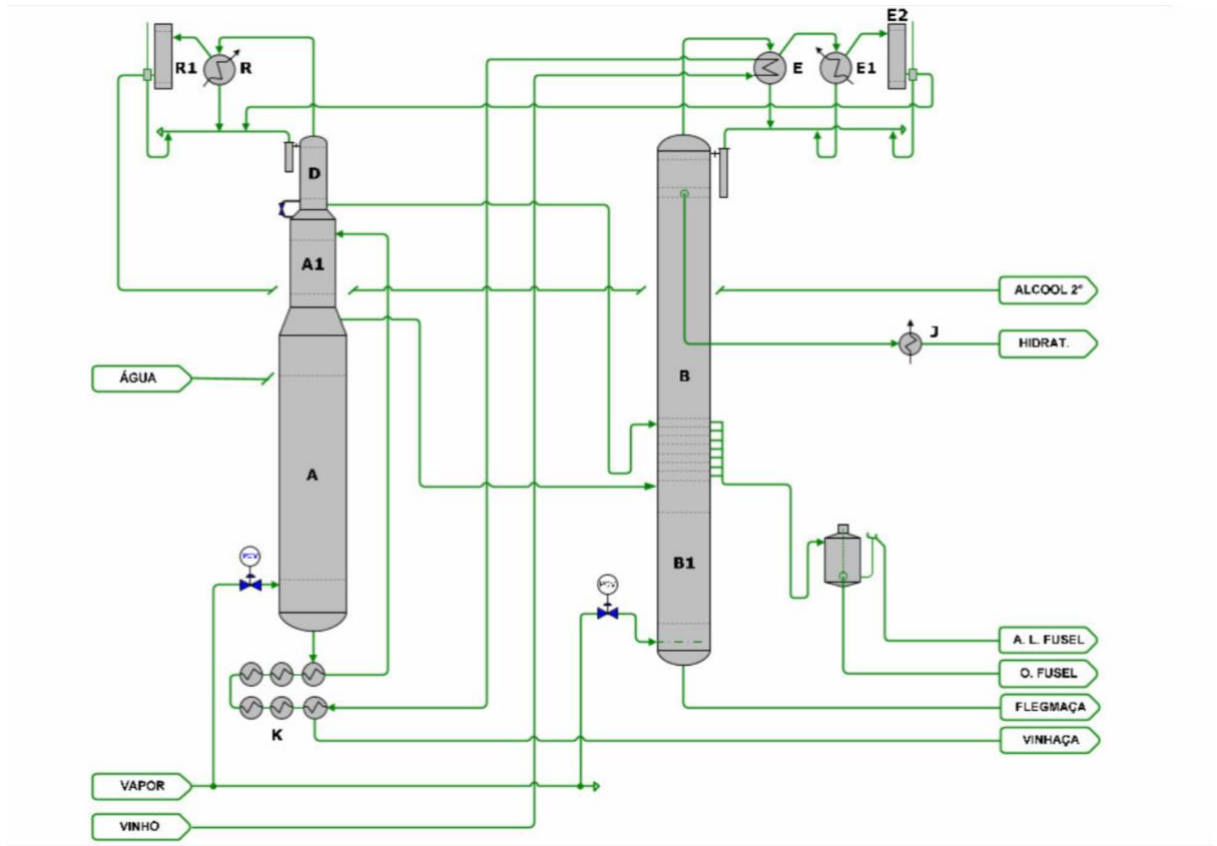
### **3.9. DESTILAÇÃO**

O processo de destilação realizado nas usinas brasileiras é realizado por um conjunto de 5 colunas, sendo elas: A, A1, B, B1 e D. O processo tem como objetivo gerar um vinho concentrado com alto teor de etanol com variações que estejam dentro de 92,6% e 93,8% em massa, estão próximos ao ponto azeotrópico para a produção álcool etílico hidratado carburante (ALBARELLI, 2013).

Nesse processo, o vinho é primeiramente submetido a duas etapas de aquecimento para que a temperatura correta para destilação seja atingida. A primeira etapa do aquecimento ocorre no topo da coluna B, onde está localizado um trocador de calor, o qual esquenta o vinho até 60° C. O segundo aquecimento é realizado por um produto de fundo da coluna A e é aquecido até a temperatura final ser equivalente a 93° C (ALBARELLI, 2013).

As colunas A, A1 e D são responsáveis por produzir uma flegma líquida e vapor que são enviados retificação. Esse material é recebido pelas colunas B e B1 sendo estas um conjunto de colunas de esgotador/retificador, a ação desse conjunto gera o etanol hidratado (ALBARELLI, 2013). A figura 11 apresenta um esquema representativo das colunas de destilação do etanol.

Figura 11: Colunas de destilação de etanol.



Fonte: MEIRELLES 2006.

Legenda: Exemplo de colunas de etanol, mais especificamente as citadas no texto (D, A1, A, B e B1) responsáveis por gerar o etanol anidro.

### 3.10 DESIDRATAÇÃO

Essa etapa tem como objetivo desidratar o etanol hidratado obtido para que este se torne etanol anidro. Pode ser realizada com diferentes técnicas, mas de maneira geral, as mais adotadas consistem em processos que se utilizam de agentes desidratantes, como por exemplo, o ciclo-hexano e monoetilenoglicol. Entretanto, nos últimos anos há o crescimento da adoção de processos físicos para a separação das moléculas de água em relação às de etanol, utilizando uma coluna de adsorção, porém esse equipamento possui um alto investimento financeiro para sua instalação (ALBARELLI, 2013).

## **4. CAPÍTULO 2: ETANOL 2G E *TRICHODERMA REESEI***

### **4.1 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

O etanol é um combustível de fonte renovável e sustentável, visto que mesmo o resíduo de sua matéria prima ainda é utilizado para fornecer energia para a própria usina, algo que não ocorre no processo de extração do petróleo nem nas refinarias para a produção da gasolina. O etanol de segunda geração é um aliado ao meio ambiente, pois com ele é possível se utilizar da mesma unidade de matéria prima duas vezes, não sendo necessário o aumento de hectares no cultivo da cana para que seja possível aumentar a produção de etanol, além do bagaço poder ser armazenado por longos períodos, podendo ser utilizado para a produção de combustível de 2G enquanto a cana-de-açúcar está fora da época de colheita (MELO, 2020).

O etanol de segunda geração é produzido a partir do bagaço ou da palha da cana, para esse processo o material passa por processos físicos e químicos a fim de limpar o material e expor as fibras, tal etapa é denominada como pré-tratamento. Após esse processo, é realizado a hidrólise enzimática, que é responsável por decompor as fibras vegetais presentes no bagaço/palha da cana-de-açúcar, além das enzimas específicas, também são utilizados alguns ácidos que transformam a matéria sólida em líquida, sendo assim submetido a fermentação, seja por meio de bactérias e/ou leveduras, que fermentam o produto gerando etanol graças aos açúcares ali presentes (LORENZI, 2019).

### **4.2 PROCESSOS DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO:**

#### **4.2.1 PRÉ-TRATAMENTO**

O pré-tratamento da biomassa é a etapa mais desafiadora de todo o processo de produção de etanol de 2G onde se é solubilizado e separado um ou mais componentes do bagaço. Graças a estrutura cristalina da celulose e a presença de ligações entre celulosas e hemicelulosas presentes na parede celular vegetal, o pré-tratamento se torna de suma importância para a produção, pois é visada a separação da matriz de lignina, neutralizar a cristalinidade da celulose com o objetivo de aumentar sua parte amorfa e solubilizar a hemicelulose, separando hidrolisado e celulose, sendo assim mais suscetível a sofrer os processos de hidrólises químicas e biológicas (CHEMMÉS et al., 2013)

Antes de ser realizado o tratamento termoquímico é realizada a secagem, sendo essa uma das etapas principais para o processamento de resíduos lignocelulósicos, tendo como

objetivo extrair e reduzir a quantidade de água presente no material, aumentando a longevidade para armazenamento da matéria, posto que com a presença de umidade a deterioração ocorre de maneira mais acelerada além de ser um ambiente favorável para atividades microbianas indesejáveis, processos químicos de oxidação e atividades enzimáticas (RODRIGUES et al., 2017)

O bagaço passa por processo de moagem que reduz o tamanho de suas partículas que tem como objetivo expandir a área de superfície, diminuir a polimerização das moléculas de celulose para que estas se tornem acessíveis a hidrólise, uniformizar a dimensão das partículas, esses processos ajudam no bom desempenho e eficiência nos tratamentos que o bagaço é submetido em sequência. O tamanho da partícula influencia diretamente no resultado do pré-tratamento devido a área de contato que se tem exposta que entrará em contato com os reagentes químicos na estrutura lignocelulósica, sendo estas ações de superfície. Há diversos tipos de pré-tratamento sendo eles químicos, físicos ou físico-químicos (RODRIGUES et al., 2017; CHEMMÉS et al., 2013).

#### **4.2.2 PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO**

Os tratamentos físicos podem ser classificados em micro-ondas e redução mecânica. O método micro-ondas se utiliza do grande desempenho para aquecimento do eletrônico além de ser de fácil manuseio. O método aplicado se utiliza de efeitos térmicos e não térmicos para o micro-ondas em ambientes com presença de água, onde é gerado calor no interior da biomassa pela radiação do micro-ondas, que vibram as moléculas de água presentes alinhadas em um campo eletromagnético com constantes alterações através de feixes de elétrons, criando um ponto heterogêneo e de calor na parte interna da biomassa. Essa característica própria de aquecimento cria um efeito de explosão entre as partículas que auxilia na desestruturação das estruturas recalcitrantes de lignocelulose, além de gerar um ambiente ácido que favorece a auto-hidrólise. Esse método apresenta um rendimento variável de 43 a 55% de açúcares redutores totais disponíveis (SARKAR et al., 2012).

Já no tratamento de redução mecânica consiste na fragmentação da biomassa seja por moagem, picotagem ou trituração, que diminuem a cristalinidade da celulose. Há também os processos de moagem úmida, a seco, vibratória de esferas e compressão. A redução de tamanho das partículas da biomassa ajuda no processo, entretanto vale ressaltar que partes muito pequenas e finas podem atrapalhar os processos seguintes, podendo gerar grandes aglomerados durante as etapas que envolvem líquidos. (SARKAR et al., 2012; CHEMMÉS et al., 2013)

Há também o tratamento de explosão a vapor que atua quimicamente e fisicamente (físico-químico) no material lignocelulósico onde a biomassa fica em contato direto com o vapor saturado e alta pressão de 2 a 30 minutos e depois sofre a descompressão rápida pela pressão atmosférica, gerando uma explosão. Esse processo ajuda desfibrar a biomassa com facilidade, a reduzindo em partículas menores aumentando a superfície de contato e quebrando a parede celular, facilitando a sacarificação. A técnica é de baixo consumo de energia quando comparada aos demais processos físicos, possui menor impacto ambiental e menor investimento financeiro e pode ou não utilizar agentes ácidos ou alcalinos (MELO, 2020; OGEDA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2017).

### 4.2.3 PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO

O tratamento químico pode ser realizado de duas maneiras, se utilizando de agentes ácidos ou alcalinos (RODRIGUES et al., 2017).

O procedimento com ácidos se apresenta como o mais eficiente na obtenção da xilose proveniente da hidrólise da hemicelulose, tendo uma variação de 75 a 90% sendo este o monossacarídeo adquirido em maior quantidade sendo obtidos também, em menor quantidade, outros açúcares como arabinose e glicose. Embora tenha alta taxa de sucesso na recuperação de açúcares, há um problema com a formação de subprodutos como furfural e ácido acético, indesejáveis para a produção de etanol por afetarem negativamente os processos fermentativos. Na indústria é utilizado ácido diluído como ácido clorídrico (HCl), ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sendo este o mais utilizado) e temperaturas até 120 °C a fim de reduzir a formação desses inibidores (RODRIGUES et al., 2017).

No tratamento com ácido diluído, a produção de xilose a partir da hemicelulose se apresenta mais eficiente em condições mais suaves para tratamento devido a estrutura cristalina da celulose, que só é afetada de maneira significativa em condições mais abruptas. Essa etapa é realizada de duas formas: rápido – alta temperatura (5 minutos a 180 °C) e lento e baixa temperatura (30 a 90 minutos a 120 °C). Entretanto, com temperaturas médias (140 °C a 170 °C) pode se obter uma taxa de quase 100% de hemicelulose hidrolisada (RODRIGUES et al., 2017). O pré-tratamento que utiliza ácido diluído pode ser feito em reatores de fluxo de tampão, entretanto também podem ser utilizados reatores de contracorrente ou contracorrente contínua (JØRGENSEN et al., 2007).

Há também o tratamento com solventes orgânicos que tem o propósito de realizar duas ações principais: A deslignificação do material lignocelulósico, alcançada pela solubilização da

lignina e de parte da hemicelulose, resultante da quebra das ligações de hidrogênio; e o aprimoramento da conversão, favorecido pelo aumento da penetração do solvente e a dissolução da biomassa. Os solventes comumente empregados, como etanol, metanol, propanol e acetona, destacam-se por desempenhar funções essenciais no transporte de hidrogênio, limitando os efeitos de difusão e aprimorando o desempenho da reação em comparação com meios aquosos (MELO, 2020).

Organosolv é um tratamento inovador que separa a biomassa vegetal em celulose, lignina e hemicelulose em um alto grau de pureza utilizando etanol (40-60%) e água aquecidos de 160 a 200 °C de 30 min a 1 hora, como solventes em um reator batelada. O ácido sulfúrico é comumente utilizado como catalizador, uma grande parcela das hemiceluloses é removida e até certo ponto apresentam degradação em furfural por exemplo. Uma de suas vantagens é a redução de etapas no processo de obtenção de frações com alta pureza além de redução do custo total do processo (EMBRAPA; JØRGENSEN et al., 2007). Entretanto, ele apresenta desvantagens, sendo elas: para evitar que a lignina dissolvida se precipite, é necessário que os sólidos pré-tratados sejam lavados com solvente orgânico antes da água. Além disso, os solventes orgânicos são de custo elevado e precisam ser recuperados o máximo possível, tal prática aumenta o consumo de energia e conseqüentemente o custo da produção. Outrossim, este pré-tratamento precisa de um acompanhamento de controle minucioso devido à alta instabilidade dos solventes (MELO, 2020)

Já o pré-tratamento alcalino tem como principal função sobre a biomassa induzir a deslignificação, que envolve o amolecimento e solubilização da lignina, que resulta na maior acessibilidade da hemicelulose e celulose a processos de hidrólise subsequente. O uso de agentes alcalinos provoca o inchaço das fibras, influenciando as ligações da hemicelulose e celulose e, conseqüentemente, aumentam a porosidade da biomassa (RODRIGUES et al., 2017).

Os componentes químicos alcalinos utilizados mais amplamente são: amônia, hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ), sendo NaOH (concentração de 62 a 65% em solução) o mais estudado, contudo, o  $\text{Ca(OH)}_2$  se mostra tão efetivo quanto para tratamento e possui menor custo se comparado ao NaOH. A amônia vem sendo submetida a diversos testes em resíduos e se mostra extremamente seletiva na remoção da lignina e abertura dos resíduos lignocelulósicos. O pré-tratamento alcalino apresenta desvantagens como a desacetilação da hemicelulose, que resulta na geração de ácido acético em solução além de desvantagens adicionais, como os longos tempos de tratamento, que podem variar de horas a dias, e a necessidade de neutralizar o hidrolisado. A amônia também tem sido

submetida a testes em diversos resíduos, demonstrando alta seletividade na remoção da lignina e abertura do resíduo lignocelulósico. Uma vantagem adicional é a facilidade de recuperação da amônia devido à sua alta volatilidade (RODRIGUES et al., 2017).

O método de Explosão de Fibra de Amônia (AFEX) apresentou resultados positivos no pré-tratamento de resíduos de milho, palha de arroz e capim. No AFEX, o material lignocelulósico é submetido a um tratamento com amônia líquida em temperaturas moderadas de 90 a 100°C e alta pressão de 17 a 20 bar por um período de 5 a 10 minutos. Uma característica única do AFEX é sua eficácia no processamento de materiais com teor de matéria seca de até 60%. A amônia utilizada no pré-tratamento pode ser recuperada, e, ao contrário da maioria dos outros métodos, o método AFEX não gera uma parte líquida com produtos dissolvidos durante o pré-tratamento, uma vez que a amônia é evaporada (JØRGENSEN et al., 2007).

#### 4.2.4 PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO

No pré-tratamento biológico são utilizados alguns fungos e bactérias. Durante esse processo os microrganismos em contato com a biomassa secretam enzimas extracelulares como lacases, lignina e peroxidases que auxiliam em boa parte da remoção da lignina presente na biomassa. Sua vantagem é baixo custo de valor energético, que é reduzido graças ao menor valor operacional, pois os microrganismos utilizados estão submetidos a temperatura e pressão amenas e não é necessário o uso de agentes químicos. Entretanto essa técnica exige um monitoramento rigoroso quando ao crescimento destes microrganismos, possíveis baixas de hidrólise e a duração do pré-tratamento (MELO, 2020).

A degradação do complexo lignocelulósico tem como objetivo liberar celulose e pode ser realizado por fungos de podridão marrom (grupo de fungos que degradam a celulose), podridão branca (capazes de degradar celulose e lignina), e fungos de podridão mole (que degradam lignina e hemicelulose). Entre esses, os fungos de podridão branca demonstram maior eficácia ao serem utilizados no pré-tratamento. Uma cepa mutante, sem celulase, foi desenvolvida para degradação seletiva da lignina e preservação da celulose, mas em muitos casos a taxa de hidrólise teve baixo rendimento. Este método é seguro e energeticamente eficiente devido ao menor suporte mecânico, mas não é tão amplamente aplicado devido as desvantagens citadas acima. Uma pesquisa de pré-tratamento biológico de colmos de bambu com fungos de podridão branca conduzido em baixas temperaturas (25 °C). No estudo com o microrganismo marinho *Phlebia sp.* MG-60, a suplementação do substrato com um meio

nutritivo, como o Meio de Kirk, resultou em melhor delignificação em comparação com água esterilizada. A biodelignificação geralmente demanda períodos prolongados (SARKAR, 2012)

Devido ao baixo rendimento, alguns tratamentos biológicos são realizados em conjunto com tratamentos físico-químicos. Pesquisadores conduziram um pré-tratamento combinado de *Populus tomentosa*, utilizando fungos de degradação branca e o sistema de água quente. A combinação demonstrou eficácia na remoção de hemicelulose e facilitou a digestão da celulose em comparação com o uso exclusivo do tratamento com água quente. A maior remoção de hemicelulose (92,33%) foi alcançada pela combinação de *Lenzites betulina* com o tratamento de água quente, resultando em um aumento de 2,66 vezes no rendimento de recuperação de glicose (RODRIGUES et al., 2017).

### **4.3 HIDRÓLISE**

#### **4.3.1 HIDRÓLISE ÁCIDA**

Uma das tecnologias mais avançadas que se tem é a hidrólise ácida. Uma otimização na utilização dos carboidratos presentes em materiais lignocelulósicos é alcançada por meio de um processo de hidrólise em duas etapas. Na primeira etapa é realizada a hidrólise da hemicelulose e a conversão da celulose em glicose ocorre na segunda etapa (MELO, 2020).

No método de hidrólise com hemicelulose, celulose e ácido concentrado na biomassa são quebradas em temperaturas baixas (inferiores a 100°C) usando soluções aquosas de ácidos fortes, como H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (ácido fosfórico), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico) e HCl (ácido clorídrico). Uma grande desvantagem é a necessidade de equipamentos altamente resistentes à corrosão, o que encarece os custos na produção. Geralmente, a hemicelulose é hidrolisada mais rapidamente comparada a celulose e os monossacarídeos liberados ficam expostos ao ambiente reacional por longos períodos o que resulta na degradação e perda desses açúcares. A recuperação do ácido é fundamental para a preservação do meio ambiente e por motivos econômicos (MELO, 2020).

Na hidrólise ácida diluída, ácido sulfúrico diluído é adicionado e misturado à biomassa para hidrolisar a hemicelulose em xilose e outros açúcares. A mistura é mantida a uma temperatura entre 120°C e 220°C por curtos períodos. Assim a parte hemicelulósica da parede celular da planta é despolimerizada, aumentando a digestibilidade da celulose nos resíduos sólidos. No entanto, graças a altas temperaturas ocorre a degradação de boa parcela dos açúcares e lignina solúvel, resultando na inibição da fermentação. Essa é uma desvantagem da hidrólise ácida diluída, já que em temperaturas mais elevadas podem gerar inibidores (MELO, 2020)

### 4.3.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática, diferente da ácida, utiliza menos energia e necessita de condições ambientais mais amenas para sua execução, possui custo acessível além de ser menos corrosiva que a hidrólise ácida e não há formação de produto inibitório que atrapalhe o processo de fermentação. Em contrapartida, as enzimas celulase, responsáveis pela hidrólise, são de extrema especificidade em relação ao substrato (SARKAR, 2012).

Aqui, as enzimas celulase e hemicelulase são responsáveis por promover a quebra das ligações da celulose e hemicelulose. A celulose contém glucano diferente da hemicelulose contém diversos tipos de açúcar, tais como manana, xilana, glucana, galactana e arabinana. As enzimas celulase englobam endo, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidases. A endoglucanase atua nas regiões que possuem baixa cristalinidade na fibra de celulose, a exoglucanase remove as unidades de celobiase das extremidades da cadeia livre e as unidades de celobiose são hidrolisadas para glicose por meio da  $\beta$ -glicosidase. As enzimas hemicelulolíticas são mais complexas, constituindo uma mistura de pelo menos oito enzimas, sendo elas: endo-1,4- $\beta$ -D-xilanases, exo-1,4- $\beta$ -D xilocur onidases,  $\alpha$  -L-arabinofuranosidases, endo-1,4- $\beta$ -D mananases,  $\beta$ -manosidases, acetil xilano esterases,  $\alpha$  -glucoronidases e  $\alpha$  -galactosidases. A celulose é transformada em glicose, enquanto a hemicelulose origina diversas pentoses e hexoses. Diversas espécies de fungos, como os do gênero *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, dentre outros são capazes de expressar a celulase, mas também podem ser utilizadas bactérias como *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermonospora*, *Bacillus* e outras (SARKAR, 2012).

*Trichoderma* é uma das cepas fúngicas mais estudadas na produção de celulasas e hemicelulasas. *Trichoderma* tem a capacidade de produzir pelo menos duas celobiohidrolases, cinco endoglucanases e três endoxilanases. No entanto, *Trichoderma* não possui atividade de  $\beta$ -glicosidase, a qual desempenha um papel eficiente na conversão de polímeros. Por outro lado, *Aspergillus* é um produtor muito eficiente de  $\beta$ -glicosidase. A celulase de *Trichoderma*, quando suplementada com  $\beta$ -glicosidase adicional, foi estudada em várias ocasiões. A combinação da celulase ZU-02 de *Trichoderma reesei* e celobiase de *Aspergillus niger* ZU-07 melhorou o rendimento de hidrólise para 81,2%, com atividade de celobiase aumentada para 10 CBU/g de substrato (SARKAR, 2012).

Diversos fatores influenciam os rendimentos de açúcares monoméricos provenientes da lignocelulose. Temperatura, pH e taxa de mistura são os principais fatores na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. Podemos observar outros fatores que afetam o rendimento: concentração de substrato, carga enzimática de celulase e adição de surfactante.

Altas concentrações de substrato podem levar à inibição enzimática. A celulase contribui significativamente para o custo total da tecnologia de etanol lignocelulósico. Portanto, a seleção de um pré-tratamento eficiente é suma importância para reduzir a cristalinidade da celulose e remover a lignina ao máximo, reduzindo o tempo de hidrólise e a carga de celulase (SARKAR, 2012).

#### **4.4 FERMENTAÇÃO**

O microrganismo mais amplamente utilizado na fermentação alcoólica é a levedura *S. cerevisiae* graças à sua capacidade de integrar a glicose da biomassa lignocelulósica. Esta levedura é responsável pela conversão de glicose em etanol e gás carbônico, além de apresentar grande resistência ao etanol (como sabemos, o etanol é um lixo orgânico tóxico excretado pelo microrganismo). Contudo, *S. cerevisiae* é incapaz de absorver ou de fermentar pentoses como a xilose (principal componente do bagaço-de-cana). Múltiplos fatores podem causar impactos negativos referente ao rendimento em etanol durante a etapa de fermentação, sendo eles: temperatura, a quantidade de nutrientes, a presença de inibidores e o tipo de microrganismo fermentador. Nas leveduras, a eficácia do processo fermentativo é diretamente afetada pela concentração do inóculo, espécie e linhagem. A utilização de concentrações mais elevadas de inóculo possibilita a realização de fermentações mais rápidas, resultando em uma maior produtividade de etanol e menor probabilidade de contaminação por bactérias (TURA, 2013).

Após o processo de fermentação ser concluído, o produto gerado é submetido a destilação em colunas de destilação. Com peneiras moleculares o etanol é desidratado e é produzido o etanol anidro que possui uma concentração de 99,6% (MELO, 2020).

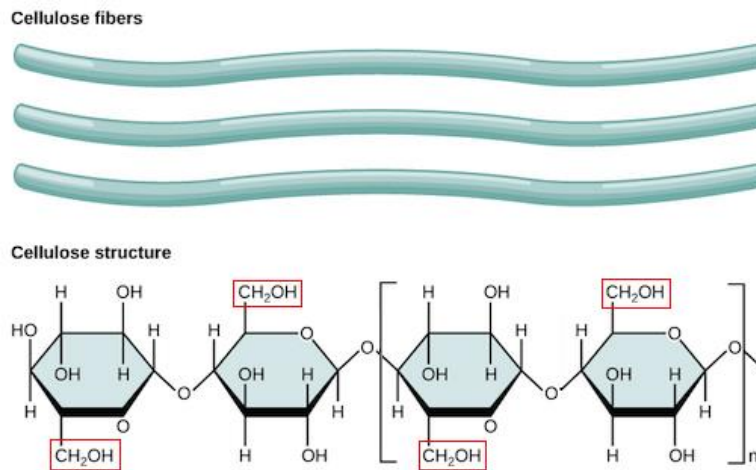
#### **4.5 COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO**

O bagaço de cana é o resíduo gerado após a moagem para a extração do caldo cana-de-açúcar durante o processo de obtenção de açúcar. No Brasil, a produção de açúcar e etanol resulta em volumes significativos de bagaço. Na safra 2010/2011, mais de 625 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram processadas, gerando aproximadamente 208 milhões de toneladas de bagaço. Esse resíduo da produção de etanol possui diversas aplicações, como por exemplo: forragem na alimentação de animais e na queima para fornecer de energia elétrica para a própria usina de etanol. Para evitar o descarte desse resíduo e reduzir os impactos ambientais, há pesquisas voltadas para sua utilização na produção de etanol de segunda geração,

dada a presença significativa de celulose e outros componentes de interesse para a indústria de biorrefinaria (NUNES et al., 2014).

A celulose é um polímero de monômeros de glicose reunidos por ligações  $\beta$ -1,4. Sua degradação é complexa devido às pontes de hidrogênio entre os resíduos de glicose, assim como ligações covalentes entre diferentes compostos, que é responsável por criar estruturas cristalinas insolúveis. Na celulose há algumas regiões de fibras não-cristalina, sendo estas amorfa e desorganizadas, o que a faz ser mais difícil de ser hidrolisada (DAL'MAS, 2017). Segue abaixo na figura 12 a representação da fibra de celulose e da estrutura química da celulose respectivamente:

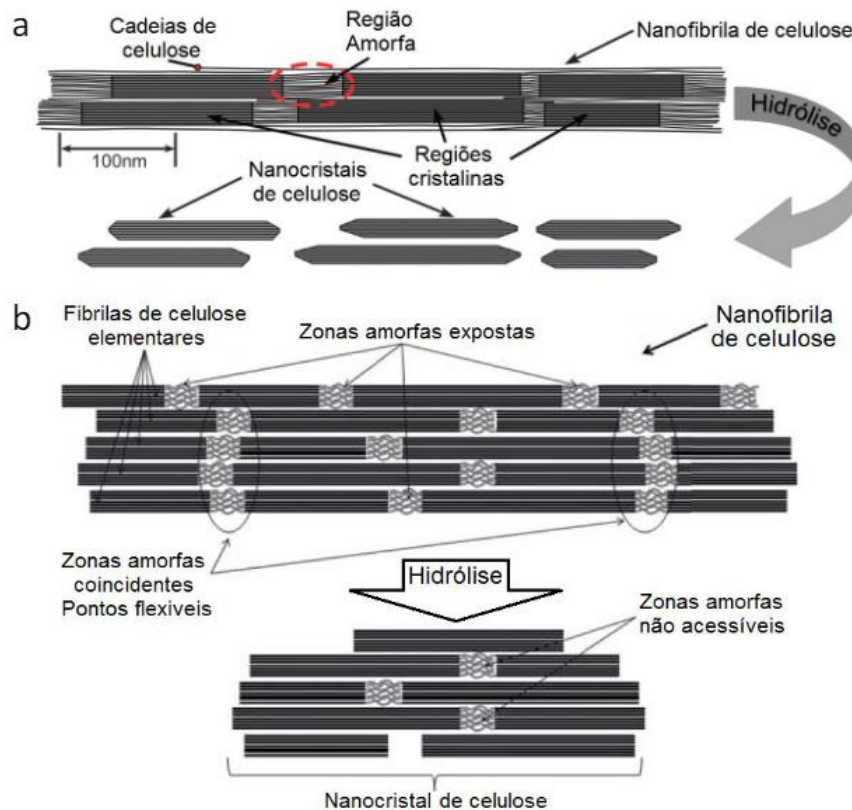
Figura 12: Estrutura da celulose.



Fonte: Imagem adaptada de OpenStax Biology.

Legenda: Representação das estruturas das fibras de celulose (parte superior). Estrutura química da celulose com seus monômeros de glicose reunidos por ligações  $\beta$ -1,4 (parte inferior).

Figura 13: Estruturas e processos de hidrólise na celulose.

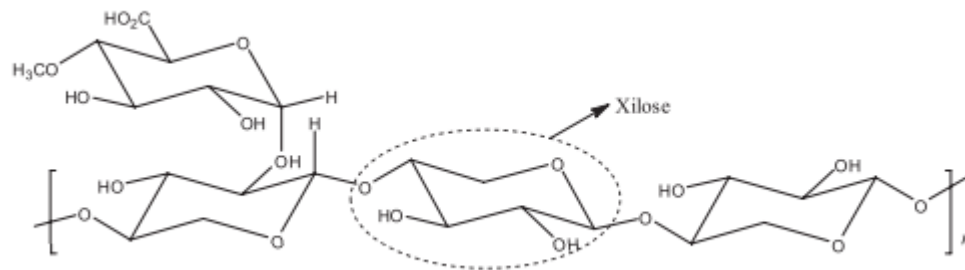


Fonte: NOVO, 2016.

Legenda: Na figura A podemos observar a estrutura da celulose, bem como suas zonas amorfas, as cadeias de celulose e nanofibras de celulose. Ainda na primeira imagem, é possível ver as regiões cristalinas, que após o processo de hidrólise viram nanocristais de celulose. Já na imagem B, é possível uma representação da celulose pós processo de hidrólise, onde as zonas amorfas são expostas e se tornam pontos flexíveis e após uma segunda hidrólise as zonas amorfias se tornam não mais acessíveis e se obtém um nanocristal de celulose.

A hemicelulose também é um polissacarídeo heterogêneo e formado por diversos açúcares como a xilose, glicose, manose e galactose. É extremamente ramificada e sua classificação é feita de acordo com o resíduo que a compõe, sendo estes: xilano, xiloglucano e galactomanano (DAL'MAS, 2017).

Figura 14: Estrutura química da hemicelulose

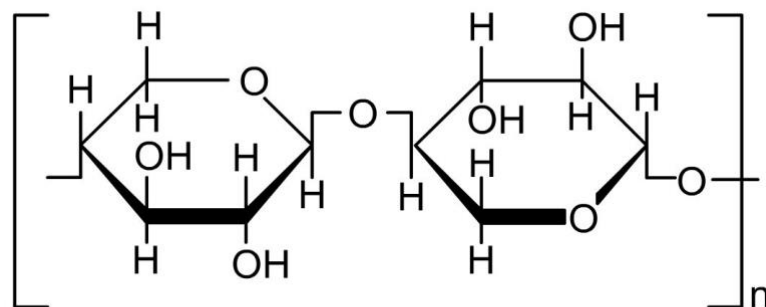


Fonte: SANTOS et al., 2012.

Legenda: Acima podemos ver a estrutura química da hemicelulose formada por glicose, manose, xilose e galactose.

O xilano é o polissacarídeo encontrado em maior quantidade na hemicelulose de monocotiledôneas (Figura 16). É formado por cadeias centrais de xilose agrupadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, das quais costumam possuir arabinose ligados a sua cadeia, que passa a ser chamado de arabinoxilano. Esta é a hemicelulose dominante na cana-de-açúcar (DAL'MAS, 2017).

Figura 15: Estrutura química do xilano.



## Xilano

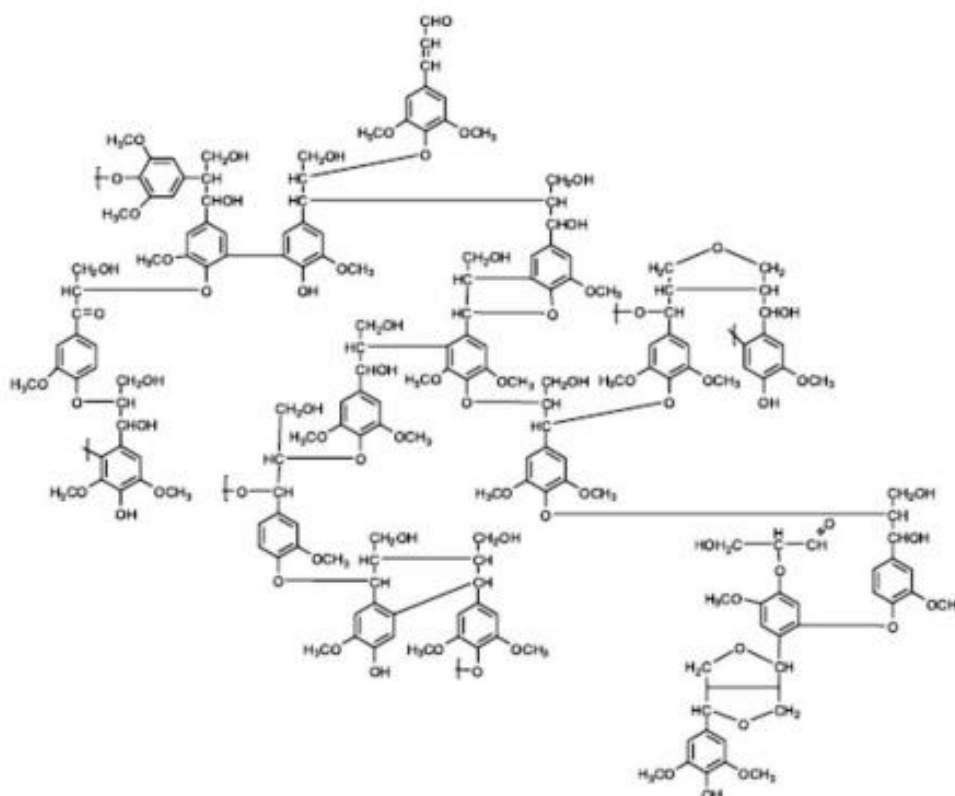
Fonte: <https://www.plantasyhongos.es/glosario/xilano.htm>

Legenda: Na figura acima podemos observar a estrutura química do xilano e suas ligações.

O xiloglucano possui uma cadeia central de glicose com ramificações de xilose, frutose e galactose, já o galactomanano é formado por uma cadeia central de manose com ramificações de galactose (DAL'MAS, 2017).

A lignina é uma macromolécula amorfa com grande resistência à degradação química e biológica. É constituída por 3 álcoois aromáticos, sendo eles coniferílico, cumarílico e sinapílico. Ele fornece alta resistência à planta a protegendo dos fatores externos. Sua presença é desvantajosa no processo de produção de etanol visto que seus compostos fenólicos ao serem liberados atrapalham o processo de fermentação, impedindo que o mesmo ocorra (DAL'MAS, 2017).

Figura 16: Representação química esquemática na lignina da cana-de-açúcar.

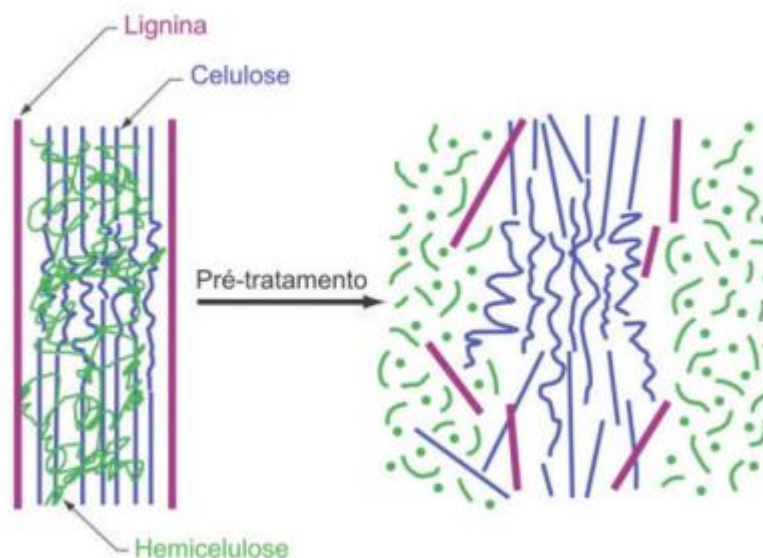


Fonte: TAVARES, 2023.

Legenda: Na figura acima podemos observar a estrutura das ligações químicas que formam a lignina na cana-de-açúcar, a qual é formada por  $\text{H}_2\text{CO}$  (metanal),  $\text{CH}_2\text{OH}$  (álcool benzílico) dentre outros.

Para a desconstrução desse material lignocelulósico é necessária a ação de diversas enzimas como  $\beta$ -glicosidases,  $\beta$ -xilosidases,  $\alpha$ -glucoronidases,  $\alpha$ -arabinofuranosidases, peroxidases, lactases dentre outras, também classificadas como celulases, hemicelulases e oxidativas. A celulose precisa ser clivada pelas endoglucanases para que sejam gerados os oligossacarídeos que terão novas extremidades. Assim as celobiohidrolases hidrolisam a celulose gerando a celobiose. As  $\beta$ -glicosidases serão encarregadas de degradar a celobiose em glicose para que se tornem monômeros facilmente metabolizáveis (DAL'MAS, 2017).

Figura 17: Estrutura da parede celular e estrutura da parede celular pós pré-tratamento.



Fonte: BALAT, 2011

Legenda: Na figura acima podemos observar a estrutura da parede celular da cana-de-açúcar antes do pré-tratamento (esquerda) e da parede celular pós pré-tratamento onde a celulose e hemicelulose são expostas expostas expostas (direita).

#### ***4.6 TRICHODERMA REESEI***

O custo elevado das enzimas lignocelulolíticas continua sendo um desafio significativo para a viabilidade comercial da produção de biocombustíveis. Em contextos industriais e de pesquisa, é crucial compreender como *T. reesei* controla a expressão de uma ampla variedade de substâncias responsáveis pela degradação da biomassa (CHEN et al., 2014).

Figura 18: *Trichoderma harzianum*, *reesei* e *atroviride*.



Fonte: FAPESP, 2018

Legenda: Na imagem podemos observar 3 placas de petri onde em cada uma delas foi cultivado um tipo diferente de *Trichoderma*.

*Trichoderma reesei* é um fungo ascomiceto, que pertencente ao filo *Ascomycota* mesofílico (ou seja, que tem como temperatura ideal para crescimento a ambiente, entre 20° C e 40 C) filamentoso e saprotróficos (heterotróficos que se alimentam através da absorção de matéria orgânica). Descoberto pelo exército americano na segunda guerra mundial, o fungo filamentoso tem grande capacidade para hidrolisar, os polissacarídeos presentes na parede celular vegetal. Diferente de seu ancestral *Hypocrea jecorina*, o *T. reesei*. possui uma reprodução assexual (MARTINEZ, 2008; KUHLS, 1996; BISCHOF, 2016).

Figura 19: *Hypocrea jecorina* encontrado na natureza



Fonte: TaiEOL

Legenda: Na imagem podemos observar *Hypocrea jecorina* no tronco de uma árvore na natureza.

Possuem o mesmo agrupamento genético, de forma geral. Entretanto um agrupamento diferente na zona ITS (*Internal Transcribed Spacer*, espaço transcrito interno na tradução livre) , zona onde estão localizados os genes 18SrDNA e 28SrDNA, geram fungos de sequências quase idênticas, o que sugere que sejam de mesma espécie. Porém, graças a essa pequena zona de sequência diferente alguns terão reprodução sexuada e outros assexuada, como por exemplo: *Trichoderma longibarchiatum* (assexual) e *Hypocrea schweinitzii* (sexuada). Além do interesse em utilizá-lo na produção de biocombustíveis, também há aplicações em antibióticos e como agente de controle biológico (MARTINEZ, 2008; KUHLS, 1996; BISCHOF, 2016).

O fungo *T. reesei* foi o primeiro a ser sequenciado, permitindo que se gerassem diversas outras cepas de *T. reesei* para biocontrole e produção de enzimas (SCHMOLL 2016). A descoberta e disponibilidade dessas sequências genômicas foram fundamentais para a investigação aprofundada acerca dos mecanismos de ação e regulação das vias de concentração da resistência sistêmica das plantas, colonização entre outros. Estudos indicam que o gênero deste fungo evoluiu há 66 milhões de anos. Durante esse processo, houve um grande ganho genético, mas também perdas no genoma central de 7.000 genes. Este genoma central é o responsável por diversos genes ligados ao metabolismo como modificação pós-tradução,

renovação de proteínas acompanhantes, transcrição e transporte e metabolismo de carboidratos além de fatores de transcrição e hidrolases glicosídicas (SCHALAMUN et al., 2022).

Segundo o levantamento feito pelas pesquisadoras Monika Schmoll e Miriam Schalamun em julho de 2022, o navegador de taxonomia NCBI cita mais de 400 espécies do gênero *Trichoderma*, além de 30 espécies de mesmo gênero aguardando sequenciamento.

O fato do *T. reesei* conseguir degradar a parede vegetal está atrelado a uma questão genética. Seu genoma possui um número inferior de celulasas comparado aos demais ascomicetos (SCHALAMUN et al., 2022).

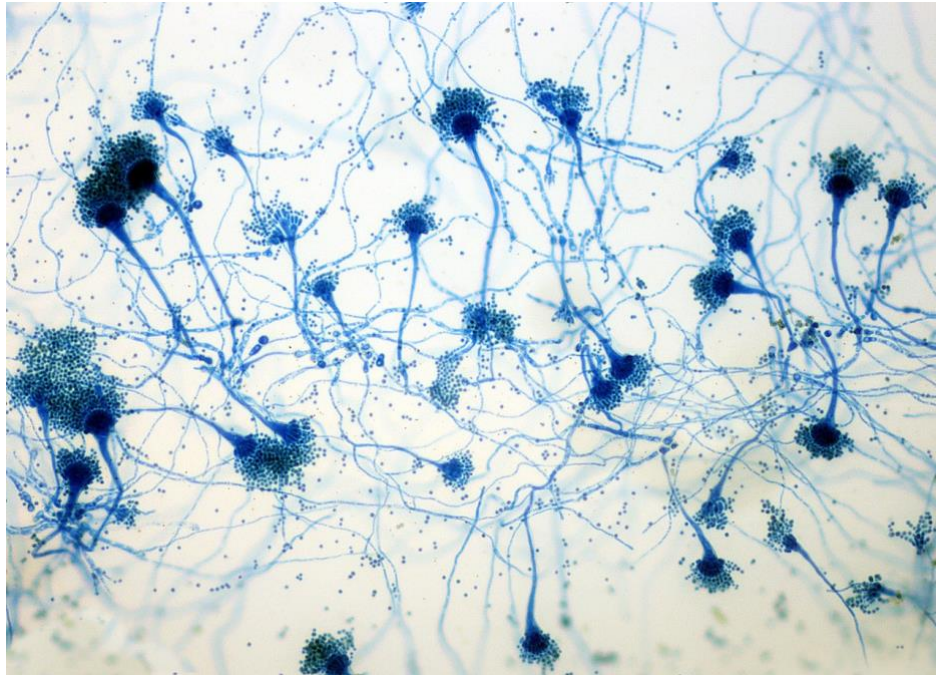
Com o *T. reesei*, a regulação do gene da celulase acontece no nível transcricional. Índícios apontam que os principais genes da celulase e hemicelulase são ativados de maneira coordenada pela presença de celulose ou de moléculas solúveis, como a lactose. Ao comparar os filtrados não processados da cultura com misturas reconstituídas de componentes isolados de celulase, é possível notar uma diminuição na eficácia da hidrólise de celulose nos coquetéis. Pode se deduzir que a ação sincronizada de elementos adicionais é indispensável para a decomposição completa da celulose (CHEN et al., 2014).

Pesquisas que utilizaram técnicas avançadas de perfil de expressão gênica em todo o genoma, como marcação de sequência expressa, hibridização subtrativa de supressão e *microarray* (técnica de biologia molecular que permite a análise simultânea da expressão gênica de diversos genes), identificaram várias enzimas e/ou proteínas com potencial para facilitar a degradação da biomassa. No entanto, devido às limitações particulares a essas tecnologias e às sequências genômicas disponíveis, ainda existem muitas proteínas de baixa abundância a qual o papel na degradação eficiente da biomassa celulósica não foi completamente decifrado em *T. reesei*. Para investigar o possível papel dessas proteínas menos abundantes na degradação da celulose, destaca-se a importância de obter um perfil preciso e extenso das enzimas ativas. Esse destaque inclui a ênfase na expressão quantitativa dessas enzimas por meio de tecnologias transcriptômicas altamente sensíveis e reprodutíveis (CHEN et al., 2014).

De forma geral, a regulação da expressão gênica associada à utilização da biomassa vegetal em fungos ocorre através da ativação de genes em resposta à presença de indutores específicos. Este processo opera em equilíbrio com a repressão da expressão gênica por meio da *Carbon Catabolite Repression* (CCR, tradução literal: pressão catabólica de carbono). A detecção dos indutores desencadeia uma via de sinalização que leva à ativação de reguladores transcricionais, resultando na produção de enzimas responsáveis pela degradação da biomassa vegetal, bem como nas vias metabólicas necessárias para utilizar os monômeros de açúcar acumulados. O controle da expressão genética desempenha um papel fundamental ao

determinar a composição das misturas enzimáticas produzidas, sendo de importância crucial para diversas aplicações. Isso tem instigado pesquisas aprofundadas em diversas espécies, como *Aspergillus spp.*, *T. reesei*, *Neurospora crassa* e *Penicillium oxalicum* (BENOCCI et al., 2017).

Figura 20: *Aspergillus spp*



Fonte: AGROCERES

Legenda: Na imagem podemos observar *Aspergillus spp* colorido quimicamente para que pudesse ser visualizado no microscópio.

#### 4.7 COQUETÉIS ENZIMÁTICOS

Para a degradação da parede celular vegetal, é necessária uma grande gama de enzimas distintas, as quais são produzidas por microrganismos lignocelulolíticos. Das classes enzimáticas responsáveis pela realização da hidrólise da biomassa lignocelulósica, destacam-se as celulases, responsáveis por catalisar a quebra do polímero de celulose através da ação sinérgica de três grupos principais de enzimas. As Endoglucanases realizam clivagens aleatórias nas ligações  $\beta$ -1,4 das áreas amorfas da celulose, gerando novos terminais redutores e não redutores. Essas enzimas são categorizadas em diversas famílias CAZy (*Carbohydrate-active enzymes*, ou na tradução livre, enzimas de carboidrato ativo), como GH5, GH7, GH12 e GH45, compartilham uma estrutura em comum que inclui uma parte contendo aminoácidos catalíticos. As enzimas Celobiohidrolases (CBH) liberam celobiose a partir de ambas as extremidades, redutoras (GH7) e não redutoras (GH6) dos fragmentos de celulose produzidos pelas

endoglucanases. Por fim, as betaglucosidases (GH1 e GH3) hidrolisam celobiose ou celooligosacarídeos em glicose. Essas enzimas são caracterizadas pelo seu arranjo que permite a identificação dos terminais não redutores e a clivagem em unidades de açúcares (FLORENCIO, 2016).

O *T.reesei* é um grande nome para a produção de celulases, suas cepas de aplicação na indústria atingem níveis de enzimas que superam 100g/l . Entretanto, em cepas convencionais de *T. reesei* é necessário o uso de indutores como por exemplo lactose, celulose pura ou soroforese, que são componentes de alto custo e que encareceriam desnecessariamente a produção de etanol de segunda geração. Outro aspecto relevante sobre as cepas convencionais é que necessitam de atividades de  $\beta$ -glicosidase e hemicelulase em quantidades consideráveis para que seja possível obter um bom desempenho na hidrólise da biomassa que recebeu o pré-tratamento. Estudos apontam uma maior eficácia quando há combinação de culturas de *T.reesei* com enzimas secretadas por outros fungos que possuem níveis mais elevados, como por exemplo *Aspergillus spp* (ELLILÄ et al., 2017).

Seria desejável que fosse necessário somente o uso de um microrganismo, para isso, o *T.reesei* poderia sofrer mutações genéticas artificiais para que o mesmo produzisse mais celulases. Alguns fatores de transcrição importantes nesse quesito são CRE1, ACE1, ACE2, HAP2/3/5 e o XYR1 sendo o mais responsável pelos níveis de expressão das hemicelulases. Com a descoberta desse fator foi desenvolvida a cepa Rut-C30, que tem altos níveis de produção de celulase (ELLILÄ et al., 2017).

Para viabilizar a conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis, é de suma importância não apenas reduzir o custo de produção das enzimas, mas também aprimorar a eficiência dos coquetéis de hidrólise. Uma alternativa eficaz para lidar com o alto custo das enzimas hidrolíticas é a imobilização dessas enzimas, que as mantém estáveis e funcionando o que permite a posterior recuperação e reutilização das enzimas, reduzindo os custos no processo de produção de biocombustíveis de segunda geração. Além disso, os surfactantes têm se destacado, posto que são aditivos mais comuns para evitar a adsorção não produtiva (inespecífica) de enzimas ao substrato, contribuindo assim para melhorar a hidrólise (SCARCELLA, 2020).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As conclusões do presente trabalho são: Com relação aos aspectos bioquímicos, a levedura *S. cerevisiae* possui o “maquinário” enzimático capaz de converter sacarose em etanol com elevado rendimento próximo do teórico. A concentração de glicose e condições de aeração causam efeitos de repressão e desvio do metabolismo celular que influenciam no rendimento em etanol.

A produção industrial de etanol 1G consiste em muitas etapas desde a colheita da cana até obtenção do etanol hidratado e anidro. No caso do etanol 2G obtido a partir do excedente de bagaço de cana é necessária uma etapa adicional de hidrólise para que possam ser liberados os açúcares fermentescíveis. No entanto, apresenta muitas vantagens como aumento da produção de etanol sem necessidade de expandir a área plantada de cana-de-açúcar, do ponto de vista ambiental, além de agregar valor aos resíduos agroindustriais.

O uso do fungo filamentosso *Trichoderma reesei* para aplicações nas etapas que antecedem a fermentação alcoólica para a produção de etanol de segunda geração são viáveis, posto que suas cepas mutantes apresentam um bom desempenho na degradação do material lignocelulósico que compõe boa parte da parede celular vegetal da cana-de-açúcar. Entretanto, ainda com o uso de cepas que produzam volumes maiores de celulasas, não é possível utilizá-lo de maneira isolada nesse processo, sendo assim necessária a aplicação de outros microrganismos e enzimas. O uso de *T. reesei* é vantajoso pois reduz o custo de produção com a diminuição de algumas enzimas que são substituídas pelo fungo.

## REFERÊNCIAS

- ALBARELLI, Juliana. Produção de açúcar e etanol de primeira e segunda geração: simulação, integração energética e análise econômica. Tese (doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, p. 216. 2013.
- BENOCCI, Tiziano et al. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnol Biofuels*. 2017.
- BISCHOF, Robert; RAMONI, Jonas; SEIBOTH, Bernhard. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb Cell Fact* 15, 106. 2016.
- BUENO, Indianara. Caracterização das linhagens mutantes do fungo *Trichoderma reesei* RUT-C30Δzface1. Dissertação (mestrado) - Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade do Oeste do Paraná. Cascavel, p. 61. 2018.
- CHEMMÉS, Camila et al. ESTUDO DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS NO PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO. UNIFACS- Seminário Estudantil de Produção Acadêmica. 2013.
- CHEN, Xiuzhen et al. Transcriptional profiling of biomass degradation-related genes during *Trichoderma reesei* growth on different carbon sources. *Journal of Biotechnology*- Vol. 173, pp. 59-64. 2014.
- DAL'MAS, Roberta M. M. T. S. Caracterização de novos fatores de transcrição de *Trichoderma reesei* envolvidos na degradação da biomassa lignocelulósica. Campinas: Editora Unicamp, 2017.
- DIAS, Marina. Simulação do processo de produção de Etanol a partir do açúcar e do bagaço visando a integração do processo e a maximização da produção de energia e excedentes do bagaço. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, p. 282. 2008.
- ELLILÄ, Simo et al. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. *Biotechnology for Biofuels*. 2017.
- FERREIRA, Jade; MARTINS, Jussara; FINZER, José. Fermentação de sacarose extraída da *Beterraba Sacarina* (*Beta Vulgaris* L.). ENCONTRO TECNOLÓGICO (ENTEC), 2015.
- FONSECA, Gabriel. Simulação e análise econômica de diferentes estratégias de fermentação e destilação para a produção de etanol hidratado a partir do caldo de cana. Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências exatas e tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 114. 2014.
- FLORENCIO, Camila. INFLUÊNCIA DOS COQUETÉIS ENZIMÁTICOS PRODUZIDOS POR *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* PELO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SEQUENCIAL NA HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. Universidade Federal de São Carlos- Centro de Ciências exatas e de Tecnologia. 2016.

JØRGENSEN, Henning; KRISTENSEN, Jan Bach; SELBY, Claus. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. University of Copenhagen. 2017.

KUHLS, K. et al. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. National Academy of Sciences. Vol. 93, No. 15, pp. 7755-7760. 1996.

LIMA, U. Produção de etanol com matérias-primas sacaríneas. In: Lima, U. A. et al. Biotecnologia Industrial 3 – Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Blucher, 2019. p. 19-70.

LORENZI, Bruno; ANDRADE, Thales. O ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO NO BRASIL, Políticas e redes sociotécnicas. Revista brasileira de Ciências Sociais - VOL. 34 Nº 100. 2019.

LOZANO, Eduardo V. Aspectos agroindustriais do cultivo de milho para produção de etanol. Bauru: Editora Unisagrado, 2018.

MATHEUCCI, Euclides J. Clonagem e caracterização do gene de actina de *Trichoderma reesei*. São Paulo: Edusp, 1993.

NUNES, Rachel; GUARDA, Emerson; SERRA, Juan; MARTINS, Álvaro. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. Revista Liberato- Vol 14, No. 22. 2013.

MELO, Nicholas. ETANOL 2G: PROCESSO PRODUTIVO E SEU CONTEXTO ATUAL NO BRASIL. Universidade Federal de Uberlândia- Faculdade de Engenharia Química. 2020

OGEDA, Thais; PETRI, Denise. Hidrólise Enzimática de Biomassa. Scielo- Quím. Nova 33 (7). 2010.

OLIVEIRA, Matheus. Produção de açúcar e etanol de primeira e segunda geração: simulação, integração energética e análise econômica. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, p. 90. 2020.

PACHECO, Thályta F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?. Brasília, 2011.

RODRIGUES, Cristine; WOICIECHOWSKI, Adenise Lorenci; LETTI, Luiz Alberto Junior; KARP, Susan Grace; GOELZER, Francieli Danubia; SOBRAL, Keli Cristina Alvim; CORAL, Jesus Davi; CAMPIONI, Tania Sila; MACENO, Marcelo Adriano Corrêa; SOCCOL, Carlos Ricardo; "Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial", p. 283 -314. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. São Paulo: Blucher, 2017.

SARKAR, Nubedita et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. ELSEVIER- Renewable Energy 37, 19-27. 2012.

SCARCELLA, Ana. Cultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em resíduos agroindustriais: consórcio microbiano no desenvolvimento de um coquetel enzimático para sacarificação de cana-de-açúcar. Universidade de São Paulo- Faculdade de Medicina de Riberão Preto. 2020.

SCHALAMUN, Miriam; SCHMOLL, Monika. Trichoderma – genomes and genomics as treasure troves for research towards biology, biotechnology and agriculture. *Front. Fungal Biol.*, Volume 3. 2022.

SCHMOLL, Monika et al. The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three Trichoderma Species. *Microbiology and molecular biology reviews*, Volume 80, número 1. 2016.

SILVA, Gabriela. Aprendizado do etanol celulósico no Brasil: o caso do projeto Dedini Hidrólise Rápida (DHR). Campinas: Editora UNICAMP, 2013.

SHIDA, Yasuke; FURUKAWA, Takonori; OGASAWARA, Wataru. Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *Trichoderma reesei*, the hypercellulolytic filamentous fungus. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 80, Issue 9, Pages 1712–1729. Oxford University, 2016

TAVARES, Andresa S. Os desafios da produção de etanol no Brasil. Uberlândia: EDUFU, 2019.

THIELMANN, Erika. Simulação e análise econômica de diferentes estratégias de fermentação e destilação para a produção de etanol hidratado a partir do caldo de cana. Tese (projeto final de curso) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 105. 2021.

TURA, Ândria. Fermentação de açúcares liberados de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas com líquidos iônicos para a produção de etanol. Universidade de Caxias do Sul- Centro de Ciências Exatas e Tecnologias. 2014.

### Material da Internet

Como ocorre a Produção Industrial de Álcool / Etanol?. Disponível em: <https://cbie.com.br/como-ocorre-a-producao-industrial-de-alcool-etanol/>. Acesso em: <07/06/2023>.

Centro Nacional das Indústrias do Setor Sucroenergético e Biocombustíveis. Nos EUA, colheita e plantio de canas inteiras diminui consumo de mudas e agiliza operação. Ribeirão Preto, 2018. Disponível em: <http://www.canaonline.com.br/conteudo/nos-eua-colheita-e-plantio-de-canas-inteiras-diminui-consumo-de-mudas-e-agiliza-operacao.html> . Acesso em: <03/11/2022>.

Processo organosolv aplicado à biomassa lignocelulósica. EMBRAPA. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agroenergia/vitrine/quimica/ativo-processo-organosolv> . Acesso em: <26/11/2023>

Produção de Cana-de-açúcar. IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cana-de-acucar/br> . Acesso em: <05/11/2022>.

Produção de Milho em espiga. IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/milho-verde-espiga/br> . Acesso em: <05/11/2022>.

Produção de Milho em grão. IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/milho-em-grao/br> . Acesso em: <05/11/2022>.

United States Department of Agriculture. U.S. Corn Exports in 2021. Washington, 2021. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/commodities/corn> . Acesso em: <03/11/2022>.