

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” -
UNESP
CAMPUS DE ARARAQUARA**

ALEX VIRGINIO ALVES DA CRUZ

**PROCESSOS DE “DOWNSTREAM” APLICADOS NA
CONVERSÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS**

Araraquara

2021

ALEX VIRGINIO ALVES DA CRUZ

**PROCESSOS DE “DOWNSTREAM” APLICADOS NA
CONVERSÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para a obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Johana
Dussán Medina

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

C955p Cruz, Alex Virginio Alves da
Processos de "downstream" aplicados na conversão de
materiais lignocelulósicos / Alex Virginio Alves da Cruz. –
Araraquara : [s.n.], 2021
53 f. : il.

Trabalho de conclusão (bacharelado) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Kelly Johana Dussán Medina

1. Biomassa. 2. Lignocelulose. 3. Processo. 4. Tecnologia
de bioprocesso. 5. Purificação. I. Título.

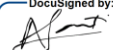
ALEX VIRGINIO ALVES DA CRUZ

PROCESSOS DE “DOWNSTREAM” APLICADOS NA CONVERSÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

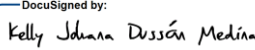
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, com parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química.

Araraquara, 20 de agosto de 2021.

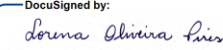
BANCA EXAMINADORA

DocuSigned by:

795FA110633F418...

Prof. Dr. Arnaldo Sarti
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

DocuSigned by:

1A9581ED7E564FA...

Profa. Dra. Kelly Johana Dussán Medina
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

DocuSigned by:

450F25585B7645A...

Profa. Dra. Lorena Oliveira Pires
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre acreditou em mim e me deu a liberdade para eu seguir o meu caminho.

Aos meus amigos de infância (Claudio, Deborah, Jamille, Jessika, Natália, Suzana e Wesley), que dividem essa jornada comigo há um bom tempo.

À república Fornalha, casa que me acolheu durante os anos da faculdade, eu aprendi muito com vocês. Agradeço também às repúblicas Hellmann's, Katakara e Pardieiro que acabaram sendo muitas vezes o meu lar também.

Aos amigos: Batman, Bola, Branquinha, Carol, Cebola, Coquetel, Dibre, Escorado, Espoleta, Eterno, Falcão, Fefa, Feloka, Figura, Fronha, Galopeira, Giu, Ioiô, Izabela, Jequiti, Kama, Limpol, Lilo, Laura, Marvada, Malibu, Montilla, Paranauê, Pardal, Piccolo, Pimenta, Pitu, Pullman, Pupila, Raj, Shay, e Susi. Obrigado pela amizade incrível de vocês.

À professora Kelly, por aceitar a ser a minha orientadora e por ser um exemplo de profissional a ser seguido.

E um agradecimento especial à UNESP, por todos os momentos bons que eu vivi e por me tornar uma pessoa melhor.

RESUMO

A instabilidade econômica e ambiental reflete em um interesse crescente por uma mudança de matéria-prima base nos processos industriais. A matéria-prima renovável (biomassa) é considerada a única fonte confiável da indústria química no longo prazo. Os compostos lignocelulósicos correspondem a cerca de 50% da biomassa vegetal. A transformação da biomassa lignocelulósica em bioproduto é chamada de bioprocesso. Os bioprocessos envolvem o uso de agentes biológicos e podem ser divididos em três etapas principais: tratamentos iniciais (*upstream process*), fermentação e tratamentos finais (*downstream process*). Cada bioprocesso possui etapas *downstream* específicas. A etapa *downstream* (purificação) confere uma maior pureza ao produto final. O processo geral de purificação é dividido em quatro etapas: clarificação, purificação de baixa resolução, purificação de alta resolução e tratamentos finais. Se o bioproduto for produzido de modo intracelular, o rompimento celular é necessário após a clarificação. O objetivo deste trabalho é apresentar diferentes tipos de purificação existentes na literatura, bem como diferentes aplicações de etapas *downstream* utilizadas no aproveitamento de biomassas lignocelulósicas. Cada bioproduto pode possuir diversos processos de purificação, o responsável deve avaliar e adequar os processos para que o projeto seja economicamente viável e se obtenha um rendimento satisfatório. A escolha de processos *downstream* é extremamente importante, pois as operações de purificação podem chegar a 80% do custo total do processo. A redução desse custo será possível com o investimento em novas pesquisas por parte do governo e empresas privadas.

Palavras-chave: Biomassa. Compostos Lignocelulósicos. Bioprocessos. Downstream.

ABSTRACT

The economic and environmental instability reflects in a growing concern in a change of raw material base in industrial processes. Renewable raw material (biomass) is considered the only reliable source for the chemical industry in the long term. Lignocellulosic compounds accounts for about 50% of plant biomass. The transformation of lignocellulosic biomass into a bioproduct is called a bioprocess. Bioprocesses requires the use of biological agents and can be divided into three main stages: initial treatments (upstream process), fermentation and final treatments (downstream process). Each bioprocess has specifics downstream steps. The downstream step (purification) gives greater purity to the final product. The general purification process is divided into four steps: clarification, low resolution purification, high resolution purification and final treatments. If the bioproduct is produced intracellularly, cell disruption is required after clarification. The objective of this work is to present different types of purification existing in the literature, as well as different applications of downstream steps used in the use of lignocellulosic biomass. Each bioproduct can have several purification processes, the person in charge must evaluate and adapt the processes so that the project is economically viable and a satisfactory yield. The choice of downstream processes is extremely important as purification operations can reach 80% of the total cost of the process. The reduction of this cost will be possible with the investment in new researches by the government and private companies.

Keywords: Biomass, Lignocellulosic Compounds. Bioprocesses. Downstream

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de blocos para alguns produtos bioderivados. _____	2
Figura 2: Fluxograma de um típico bioprocesso. _____	3
Figura 3: Exemplo da estrutura de um material lignocelulósico. _____	4
Figura 4: Estrutura da celulose. _____	6
Figura 5: Estrutura da hemicelulose. _____	6
Figura 6: Exemplo de estrutura da lignina. _____	7
Figura 7: Pré-tratamento de lignocelulósicos. _____	9
Figura 8: Representação esquemática da hidrólise da celulose. _____	11
Figura 9: Filtro rotativo à vácuo. _____	14
Figura 10: Esquema de uma centrífuga de discos com descarga por bocais. _____	15
Figura 11: Sistemática de uma centrífuga tubular. _____	16
Figura 12: Classificação de processos de separação de membranas em relação ao diâmetro do poro e a pressão. _____	18
Figura 13: Esquema de uma célula de eletrodialise. _____	20
Figura 14: Sistema em fase sólida. _____	21
Figura 15: Processo de extração utilizando fluidos supercríticos. _____	22
Figura 16: Esquema de Cromatografia de Permeação em Gel. _____	23
Figura 17: Mecanismo de cromatografia de troca iônica. _____	24
Figura 18: Destilação Fracionada. _____	25
Figura 19: Destilação Reativa. _____	26
Figura 20: Secagem por Spray Drying. _____	28
Figura 21: Isômeros ópticos do ácido láctico. _____	29
Figura 22: Rotas fermentativas do ácido láctico. _____	30
Figura 23: Reações de esterificação e hidrólise. _____	31
Figura 24: Estrutura química do ácido succínico. _____	32
Figura 25: Compostos químicos produzidos a partir do ácido succínico. _____	32
Figura 26: Via metabólica de ácido succínico em elevadas concentrações de CO ₂ . _____	33
Figura 27: Estereoisômeros do composto 2,3-butanodiol. _____	34
Figura 28: Esquema da síntese de compostos químicos derivados do 2,3-butanodiol. _____	35
Figura 29: Via metabólica da formação de 2,3-butanodiol por meio de fermentação. _____	35

Figura 30: Fluxograma de produção de etanol de segunda geração. _____	36
Figura 31: Fluxograma de processo de destilação de AEHC. _____	37
Figura 32: Processo de destilação extrativa para a produção de AEAC. _____	39
Figura 33: Fórmula estrutural do Xilitol. _____	40
Figura 34: Rotas químicas e biotecnológicas da produção de xilitol. _____	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de alguns materiais lignocelulósicos.	5
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3-BDO – 2,3-butanodiol

2G – Segunda Geração

AEAC – Álcool etílico anidro combustível

AEHC – Álcool etílico hidratado combustível

AS – Ácido Succínico

CO₂ – Dióxido de Carbono

EC – *Enzyme Comission*

GPC – Cromatografia de Permeação em Gel

H₂O – Água

SBAs – Sistemas de duas fases aquosas

SPE – Sistema em fase sólida

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	4
2.1 Celulose.....	5
2.2 Hemicelulose	6
2.3 Lignina.....	7
3. PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS.....	8
3.1 Upstream	8
3.1.1 Pré-tratamento.....	8
3.1.2 Hidrólise Enzimática	10
3.2 Fermentação.....	11
3.2.1 Fermentação submersa.....	12
3.2.2 Fermentação em meio sólido.....	12
3.3 <i>Downstream</i>	12
3.3.1 Clarificação.....	13
3.3.1.1 Filtração	13
3.3.1.2 Centrifugação.....	15
3.3.2 Rompimento Celular	16
3.3.3 Purificação de baixa resolução	17
3.3.3.1 Precipitação	17
3.3.3.2 Separação por membranas.....	17
3.3.3.3 Extração.....	20
3.3.4 Purificação de alta resolução	22
3.3.4.1 Cromatografia	22
3.3.4.2 Destilação	24
3.3.5 Tratamentos Finais	27

3.3.5.1	Liofilização	27
3.3.5.2	Cristalização	27
3.3.5.3	Secagem por <i>spray drying</i>	28
4.	DOWNSTREAM EM PROCESSOS UTILIZANDO BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS	29
4.1	Produção de Ácido Lático	29
4.2	Produção de Ácido Succínico	31
4.3	Produção de 2,3-Butanodiol.....	34
4.4	Produção de Etanol de segunda geração	36
4.5	Produção de Xilitol	40
5.	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

A matéria-prima utilizada como fonte de energia e substrato para outros produtos está diretamente relacionada com a demanda e interesses das atividades industriais. Um exemplo de cadeia é a madeira (utilizada como combustível) que foi substituída pelo carvão, que posteriormente foi substituído pelo petróleo (devido ao grande potencial de transformação em vários produtos) (CRUZ, 2012).

A instabilidade econômica e ambiental reflete em um interesse crescente por uma mudança de matéria-prima base. As incertezas com relação à oferta de petróleo e a crescente preocupação com as questões ambientais proporcionaram o desenvolvimento das indústrias renováveis (biorrefinarias), cujos produtos são obtidos por matérias-primas renováveis. A independência em relação aos produtos de origem fóssil dá uma maior segurança às indústrias, já que o preço do petróleo, utilizado como matéria-prima em diversos processos, varia bastante. (CRUZ, 2012; ALMEIDA, 2017)

Os combustíveis fósseis são recursos destinados ao esgotamento, mesmo com o avanço de novas técnicas de extração e produção de gases a partir dos mesmos. Portanto, a matéria-prima renovável pode ser considerada como a única fonte confiável da indústria química no longo prazo. (MARQUETTO, 2018)

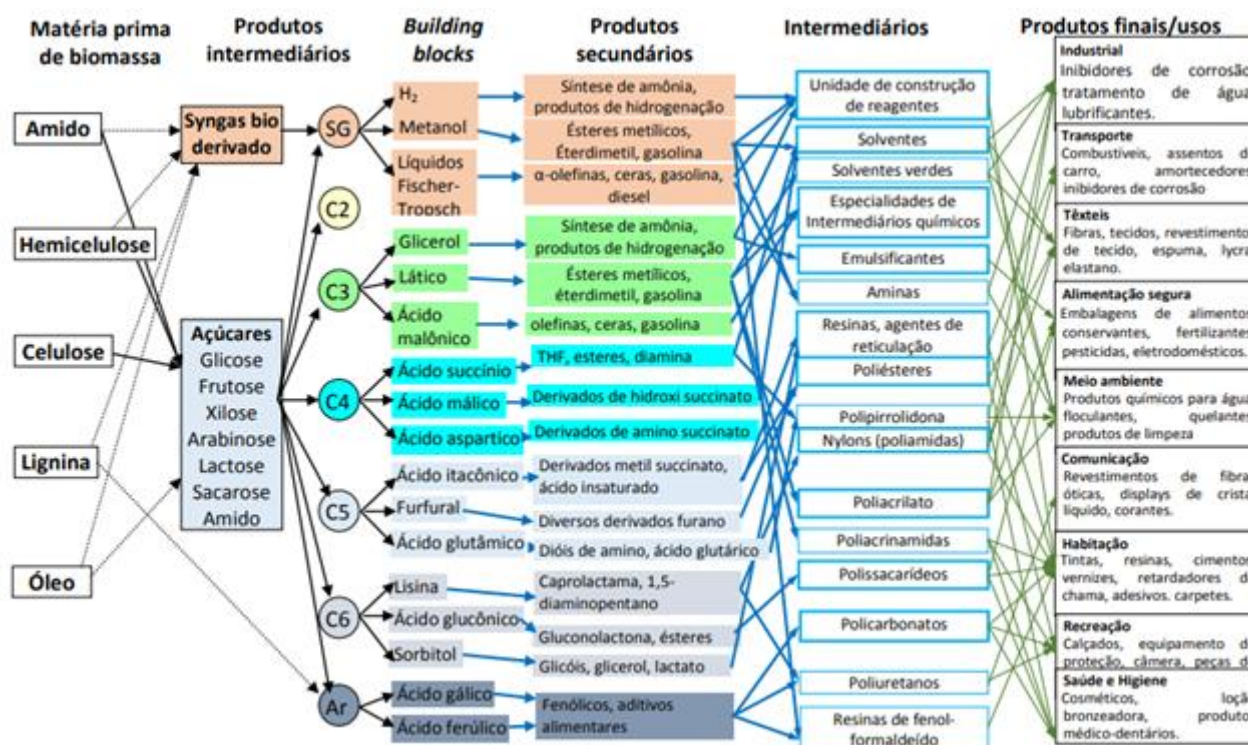
No Brasil, essa grande mudança comportamental da indústria brasileira começou com o programa Proálcool (1975). O governo conseguiu diminuir a dependência da importação do petróleo, e desde então, o etanol representa mais de 10% da matriz energética brasileira (ALMEIDA, 2017).

Há um crescente número de processos industriais que utilizam fontes renováveis como matéria-prima. Essa matéria-prima renovável é chamada de biomassa e pode ser transformada por processos termoquímicos ou bioquímicos (CRUZ, 2012).

A biomassa é definida como qualquer material orgânico derivado de planta, renovável, heterogênea e quimicamente complexa. A Figura 1

apresenta um diagrama de blocos com a diversidade de produtos obtidos utilizando a biomassa como matéria-prima (CRUZ, 2012).

Figura 1: Diagrama de blocos para alguns produtos bioderivados.



Fonte: CRUZ, 2012.

Os compostos lignocelulósicos correspondem a cerca de 50% da biomassa vegetal. O acúmulo de biomassa lignocelulósica no ambiente como resíduo gera impactos ambientais negativos, além de perdas de recursos valiosos (ALVES, 2018).

A biomassa lignocelulósica é considerada potencialmente boa como matéria-prima para quase todos compostos químicos básicos e intermediários atuais. Os principais constituintes dessa biomassa são a celulose, a hemicelulose e a lignina (MARQUETTO, 2018; ALMEIDA, 2017).

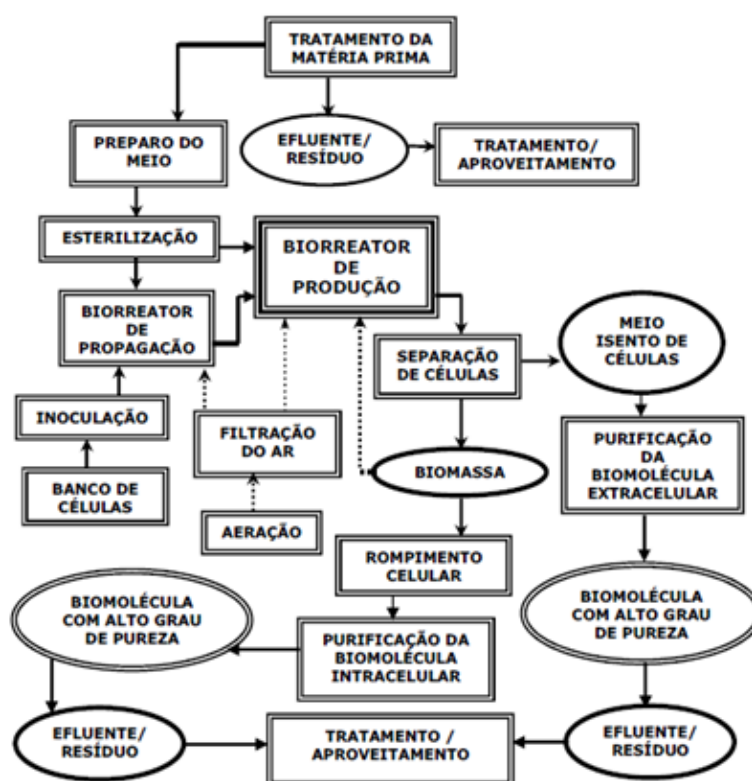
Os bioprocessos podem ser definidos como processos que envolvem o uso de micro-organismos, células e/ou enzimas. As reações que ocorrem durante o processo são controladas por esses agentes biológicos. Portanto, os processos industriais que envolvem a biomassa lignocelulósica são

classificados como bioprocessos, já que dependem de agentes biológicos para a conversão da biomassa em produto (ASSIS, 2014).

Os bioprodutos formados são divididos em metabólitos primários ou secundários. Os metabólitos primários estão diretamente relacionados com o metabolismo do agente, enquanto os secundários podem ser gerados pelo mecanismo de defesa do mesmo ou podem ser produzidos conjuntamente com os metabólitos primários durante o processo de biotransformação (ASSIS, 2014).

Esses processos estão presentes na vida humana há milhares de anos, desde a fermentação de pães e bebidas. Os processos biotecnológicos podem ser divididos em três etapas principais: tratamentos iniciais (*upstream process*), fermentação e tratamentos finais (*downstream process*). Na Figura 2 pode-se observar um exemplo de um bioprocesso (TESCAROLLO, 2020; PEREIRA *et al.*, 2018).

Figura 2: Fluxograma de um típico bioprocesso.



Fonte: PEREIRA *et al.*, 2018.

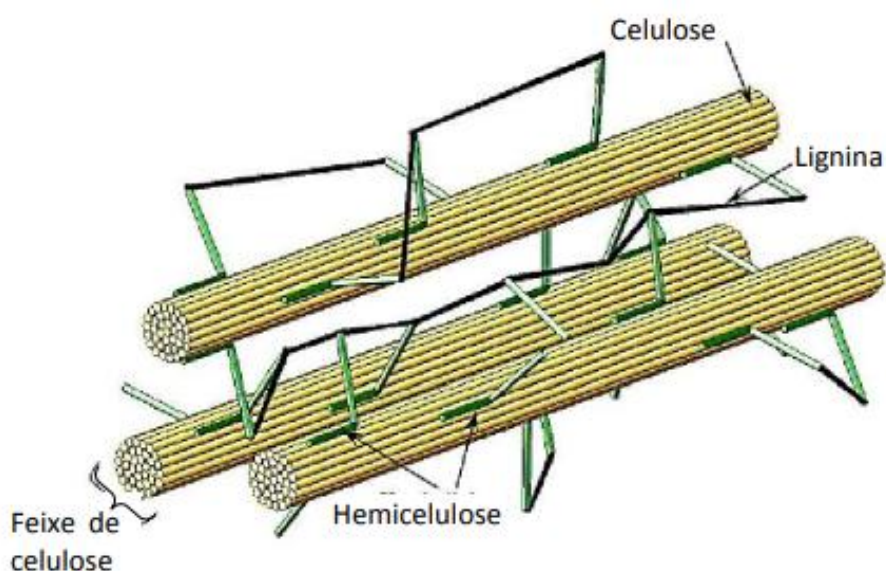
Os produtos gerados pela indústria biotecnológica são diversificados (ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormônios, aminoácidos, peptídeos e proteínas). Devido a essa diversidade, cada bioprocessos possui etapas *downstream* específicas. O objetivo da etapa *downstream* é conferir a maior pureza possível ao produto final (SCHMIDELL et al., 2001; ASSIS, 2014).

Além da procura de novas técnicas de purificação para processos industriais, há uma grande busca para a redução do impacto da etapa *downstream* na economia global do processo, já que as operações de purificação podem chegar a 80% do custo total do processo (MEDEIROS, 2008).

2. MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos são produzidos em larga escala em processos industriais, geralmente como subprodutos ou resíduos agroindustriais desses processos. As plantas superiores, madeira mole (*softwood*) ou dura (*hardwood*) e gramínea fazem parte do conjunto chamado de biomassa lignocelulósica (DUSSAN, 2013). Estes materiais são caracterizados pela presença de celulose, hemicelulose e lignina conforme apresentado na Figura 3.

Figura 3: Exemplo da estrutura de um material lignocelulósico.



Fonte: SALOMÃO, 2017.

A composição desses três componentes varia em cada material lignocelulósico. A Tabela 1 contém algumas dessas composições.

Tabela 1: Composição de alguns materiais lignocelulósicos.

Material	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Lignocelulósico	%	%	%
Farelo de cevada	23	32,7	24,4
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6
Bagaço de cana	40,2	26,4	25,2
Palha de arroz	43,5	22	17,2
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1
Palha de sorgo	34	44	20
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1
<i>Eucalyptus grandis</i>	40,2	15,7	26,9

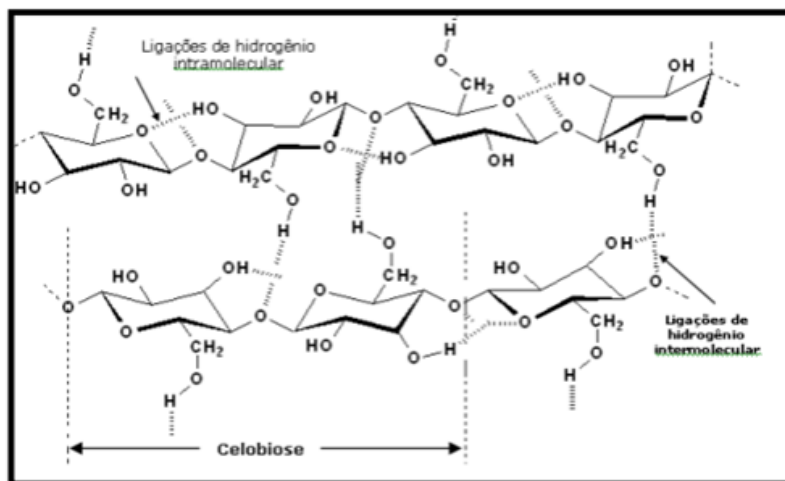
Fonte: ANDRADE, 2017.

2.1 Celulose

A celulose é encontrada em todas as plantas, sendo então o polímero mais abundante da natureza. A celulose é um homopolissacarídeo linear não ramificado formado por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1 $\rightarrow$ 4. O dissacarídeo formado por essa ligação é chamado de celobiose. Os feixes de celulose representados na Figura 4 formam microfibrilas que tornam a celulose resistente. O polímero de celulose possui alto peso molecular, contendo de 5000 a 10000 unidades de glicose (SALOMÃO, 2017, RABELO, 2010).

A celulose é definida como uma estrutura semicristalina, já que possui repetições de regiões altamente cristalinas e amorfas. As regiões cristalinas ocorrem devido a ligações de hidrogênio (Figura 4), que acarretam numa forte interação e compactação entre as moléculas. As regiões amorfas são mais acessíveis a ataques de reagentes, enzimas ou absorção de água. Sendo assim, muitos estudos são realizados com amostras amorfas (LENGOWSKI, 2013, RABELO, 2010).

Figura 4: Estrutura da celulose.

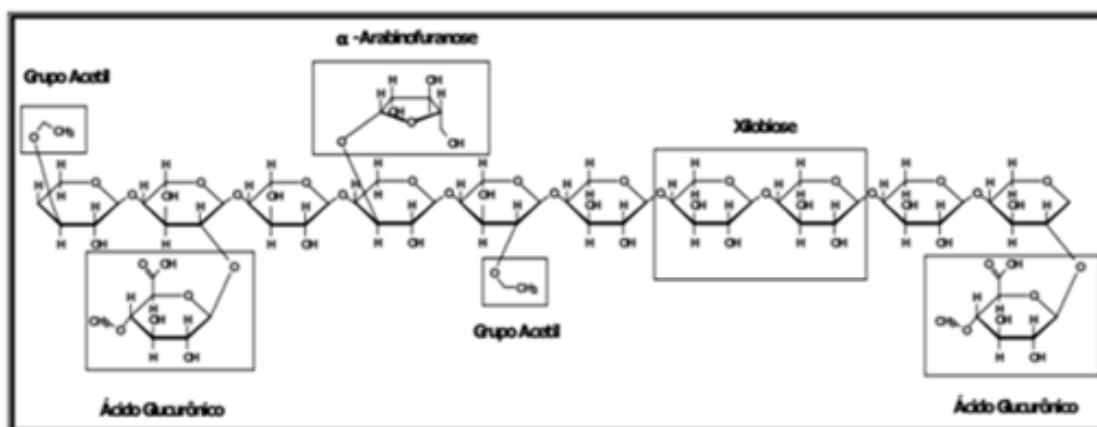


Fonte: ANDRADE, 2017.

2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado formado por uma mistura complexa de açúcares (xilose, glicose, galactose, manose, arabinose e ácidos urônicos como β -Dglucurônico, β -D-galactourônico e α -D-4-Ometilglucurônico, e alguns grupos acetil), sendo que a xilose constitui o maior componente de sua estrutura. Assim, a hemicelulose é caracterizada por seu alto grau de polidiversidade, polidispersão e polimolecularidade. A representação de uma possível estrutura de hemicelulose está contida na Figura 5 (ANDRADE, 2017, DUSSAN, 2013).

Figura 5: Estrutura da hemicelulose.



Fonte: ANDRADE, 2017.

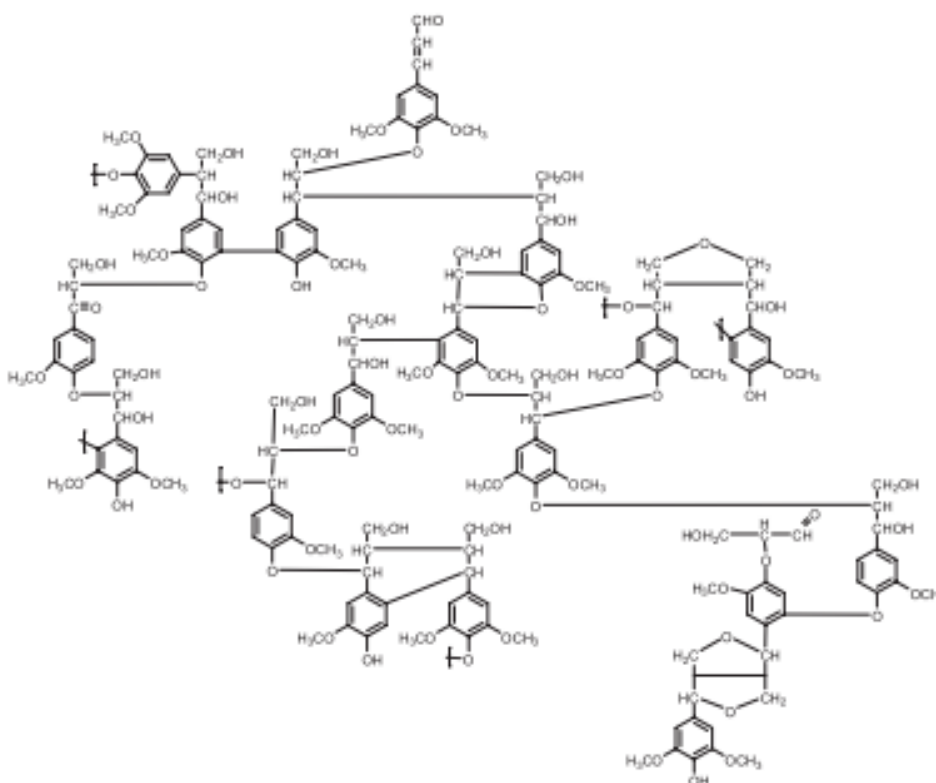
A hemicelulose é responsável por contribuir com a mobilidade interna e flexibilidade das plantas. Ainda, possui a função de auxiliar a formação das ligações cruzadas entre a lignina e a celulose (RABELO, 2010).

2.3 Lignina

A lignina (Figura 6) está presente na parede celular das plantas. A principal função da lignina é o suporte estrutural. Outras funções são o transporte de água e a proteção contra ataques microbianos (barreiras que protegem os polissacarídeos assimiláveis) (SALOMÃO, 2017).

A lignina une as fibras celulósicas, aumentando a rigidez da parede vegetal. A lignina é formada por unidades de fenilpropano com diversos tipos de ligações entre os monômeros, sendo estas ligadas por diferentes tipos de ligações covalentes. Essas diferentes ligações conferem uma alta complexidade, o que dificulta a conversão em açúcar fermentável (DUSSAN, 2013).

Figura 6: Exemplo de estrutura da lignina.



Fonte: SANTOS, 2012.

3. PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Os processos biotecnológicos podem ser divididos em três etapas principais: tratamentos iniciais (*upstream process*), fermentação e tratamentos finais (*downstream process*). Na primeira etapa, ocorrem as escolhas da matéria-prima, meios de cultura e agentes da fermentação, bem como a preparação e facilitação dos mesmos para a próxima etapa. A fermentação consiste na reação dos substratos em um reator (fermentador), produzindo os produtos desejados e outros subprodutos. Nessa etapa é necessário um controle desejável para que o processo seja satisfatório. Os tratamentos finais consistem em métodos de separação do produto requerido e os subprodutos. Para isso, existem diversas técnicas de tratamentos de resíduos (PEREIRA *et al.*, 2008).

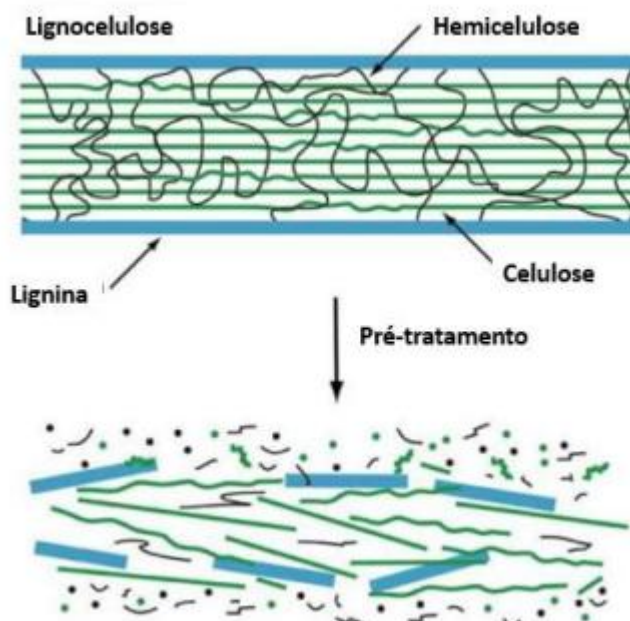
3.1 Upstream

Os processos upstream dos processos biotecnológicos consistem em preparar os materiais para a bioconversão. Os materiais lignocelulósicos, por exemplo, precisam passar por pré-tratamentos (físicos, químicos e biológicos), a fim de facilitar o acesso das enzimas da fermentação aos polissacarídeos presentes nesses materiais. A escolha da técnica de pré-tratamento depende das necessidades do processo (ASSIS, 2014; ALVIRA 2010).

3.1.1 Pré-tratamento

Os processos de pré-tratamento são divididos em físicos, biológicos e químicos. Os objetivos dos pré-tratamentos são separar os componentes lignocelulósicos, reduzir a cristalinidade da celulose, solubilizar a hemicelulose e aumentar a acessibilidade da celulose ao ataque hidrolítico por enzimas do complexo celulósico. O efeito esperado do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos está representado na Figura 7 (ANDRADE, 2017).

Figura 7: Pré-tratamento de lignocelulósicos.



Fonte: ANDRADE, 2017.

Os métodos físicos possuem como finalidade aumentar a área superficial e reduzir o grau de polimerização da celulose. Dentre os métodos físicos, destaca-se a moagem, micro-ondas, explosão a vapor, explosão a CO_2 e água quente líquida (LHW). No entanto, esses métodos possuem alto gasto energético e geralmente não removem a lignina, necessitando de processos químicos posteriormente (CHEMMES, 2013).

A utilização de fungos para o processo de deslignificação e remoção da hemicelulose é o método biológico mais comum de pré-tratamento. O método possui baixo valor energético, contudo apresenta baixa eficiência e demanda de um rigoroso controle das condições operacionais. Além disso, os fungos consomem uma considerável fração da celulose, diminuindo posteriormente o rendimento dos processos biotecnológicos (SALOMÃO, 2017).

Os pré-tratamentos químicos com ácidos (sulfúrico, clorídrico e fosfórico) têm a função de solubilizar a hemicelulose. Os pré-tratamentos com bases (hidróxidos de sódio, de potássio, de cálcio e de amônio) conseguem remover parcialmente ou completamente a lignina, por meio da degradação do éster e

das cadeias glicosídicas. Já o uso de solventes orgânicos (etanol, acetona e etilenoglicol) serve para solubilizar a lignina (CHEMMES, 2013).

É importante ressaltar que a escolha do método de pré-tratamento está altamente ligado com uma menor degradação dos carboidratos. Portanto, os métodos químicos são os mais aconselháveis para estes processos. O pré-tratamento utilizando ácidos e bases promove a remoção da hemicelulose e lignina, sem degradar quantidades grandes de celulose (LORENCINI, 2013).

3.1.2 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática consiste em reduzir a celulose em glicose utilizando enzimas. As enzimas são responsáveis pela catálise, e todas as enzimas celulolíticas pertencem ao grupo O-Glicosil hidrolases. A *Enzyme Commission* (EC) classifica a codificação das celulasas em 3.2.1.x, na qual os três primeiros dígitos conferem a atuação nas ligações O-glicosídicas e o último número varia de acordo com o mecanismo de atuação. Essas enzimas são conhecidas como celulase. A maior parte dos micro-organismos é capaz de gerar as celulasas, portanto estes são de grande interesse em processos biotecnológicos (SALOMÃO, 2017, RABELO, 2010).

As enzimas do complexo celulítico são divididas em três grupos: endoglucanases (quebram ligações internas da fibra celulósica), exoglucanases (atuam na região externa da glicose) e as beta-glicosidases (transformam açúcares solúveis maiores em glicose) (LORENCINI, 2013; VILELA, 2013).

As endoglucanases (1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase ou EC – 3.2.1.4) quebram as ligações das regiões internas da celulose, liberando oligossacarídeos de diversos tamanhos, com novos terminais redutores e não redutores. As celobiohidrolases (1,4- β -D-glucana-celobiose-hidrolase ou EC 3.2.1.91) e as celodextrinases (1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolase ou EC 3.2.1.74) são exoglucanases que atuam nos terminais redutores e não redutores da celulose, resultando em glicose e celobiose (OGEDA, 2010). As β -glicosidases (β -glicosídeo gluco-hidrolase ou EC 3.2.1.21) são responsáveis

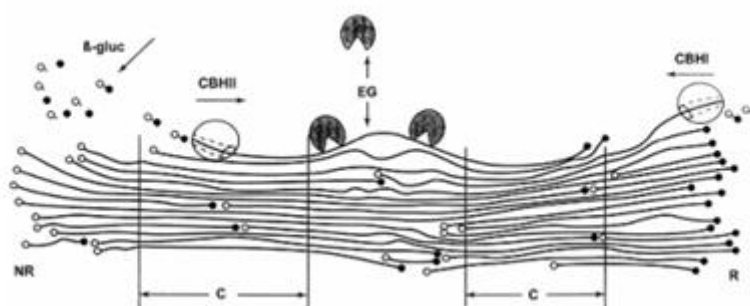
por hidrolisar as celobiose e outros oligossacarídeos solúveis em glicose (LORENCINI, 2013).

A sinergia que ocorre entre as celulasas é essencial para a eficiência do processo de hidrólise enzimática, podendo ser divididas em classes (RABELO, 2010, SALOMÃO, 2017):

- endo-exo: a enzima endo cliva a região interna da celulose, liberando os terminais para a enzima exo.
- exo-exo: os dois tipos agem nas duas extremidades (redutoras e não redutoras)
- exo- β e endo- β : as β utilizam as celobioses e oligossacarídeos liberados pelas exo e endo, resultando em glicose.

A representação da hidrólise enzimática por meio das ações das celulasas está representada na Figura 8.

Figura 8: Representação esquemática da hidrólise da celulose.



Fonte: RABELO, 2010.

Na Figura 8, a letra C corresponde à região cristalina, NR os terminais não redutores, R os terminais redutores, CBHI e CBHII são as celobiohidrolases, EG são as endoglucanases e β -gluc são as β -glicosídeos.

3.2 Fermentação

Corresponde à biotransformação de um substrato por um micro-organismo. O micro-organismo metaboliza os componentes do meio, acarretando a formação de produto e crescimento celular do mesmo. Os controles dos parâmetros estabelecidos no *upstream*, a quantidade de

substrato fornecido e a quantidade de produto formado são de extrema importância em uma fermentação. Além disso, é preciso verificar se ocorre a inibição dos micro-organismos pelos produtos, sendo necessário retirar o produto formado do meio caso ocorra esse fenômeno (ASSIS, 2014).

O processo fermentativo pode ser em estado líquido (fermentação submersa) ou em estado sólido (fermentação em meio sólido). O sistema pode ser por batelada (simples ou alimentada) ou por sistema contínuo (MONTEIRO, 2009; ASSIS, 2014).

3.2.1 Fermentação submersa

O micro-organismo é introduzido na forma de inóculo em um meio líquido. Os nutrientes necessários estão dissolvidos nesse meio, facilitando o acesso aos micro-organismos. Dentre as vantagens, pode-se citar: facilidade na manipulação, grandes volumes de meio, maior absorção de nutrientes e excreção de metabólitos, menor tempo de fermentação e maior controle do processo (agitação, aeração, pH, temperatura e oxigenação) (MONTEIRO, 2009).

3.2.2 Fermentação em meio sólido

Os nutrientes do meio estão em estado sólido na ausência ou quase ausência de água. Os substratos devem possuir umidade suficiente para que ocorra o crescimento do micro-organismo. As vantagens são: menor investimento em biorreatores, utilização de substratos com baixo valor agregado, baixa umidade diminui a contaminação, alta formação de metabólitos, facilidade na etapa de purificação (MONTEIRO, 2009).

3.3 *Downstream*

O *downstream* é a etapa que visa conferir maior pureza ao produto final. E para isso, as propriedades do produto devem ser levadas em conta. O tamanho molecular, a concentração, solubilidade, polaridade, volatilidade e se o produto está no interior ou no exterior do micro-organismo são características necessárias para a escolha do processo *downstream* (ASSIS, 2014).

As propriedades físico-químicas do meio de fermentação também são importantes para a decisão de escolha. Dentre as propriedades, pode-se citar viscosidade, densidade, impurezas e subprodutos (ASSIS, 2014).

Após a fermentação, o meio resultante contém o produto de interesse, os micro-organismos fermentadores, subprodutos da fermentação, fragmentos celulares, células mortas, sais, carboidratos, lipídeos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos e muitas outras moléculas, provenientes da fermentação ou de nutrientes adicionados na etapa de *upstream* (ASSIS, 2014).

Os produtos formados em uma fermentação podem estar dentro ou fora da célula do micro-organismo, dependendo das características citológicas e fisiológicas do mesmo. Caso as moléculas de interesse estejam no meio intracelular, é necessário que ocorra o rompimento das células, e para isso, utilizam-se determinados processos *downstream*. O conhecimento da composição da biomolécula é importante para que a escolha da técnica *downstream* não danifique as mesmas quando houver o rompimento das células do micro-organismo fermentador (PEREIRA et al., 2008).

O processo de purificação pode ser dividido em quatro etapas principais: clarificação, purificação de baixa resolução, purificação de alta resolução e/ou tratamentos finais. Caso o produto esteja dentro da célula, o rompimento celular é uma nova etapa necessária após a clarificação (SCHMIDELL et al., 2001).

3.3.1 Clarificação

Processo de remoção de materiais insolúveis (particulados). O meio clarificado (filtrado) é aquele que não possui células. Portanto, a clarificação é o processo que separa as células (suspensas, mortas ou fragmentos) do meio fermentado. Os métodos mais utilizados são a filtração e a centrifugação (SCHMIDELL et al., 2001).

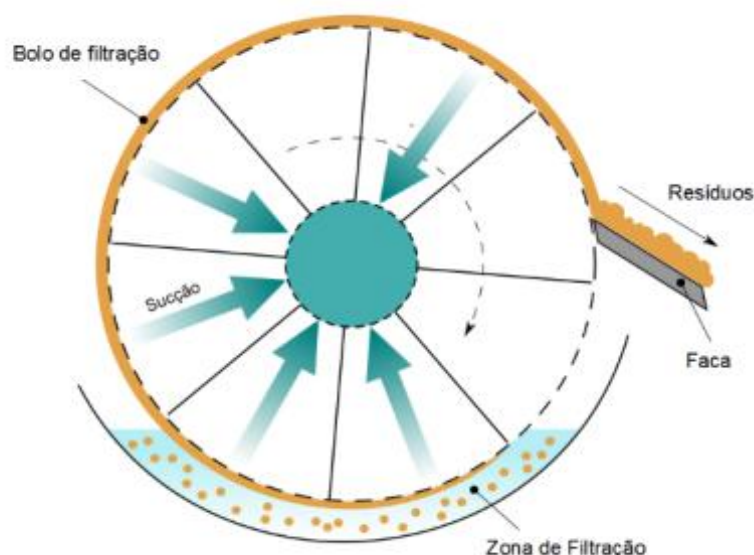
3.3.1.1 Filtração

Processo de separação de sólidos dispersos ou suspensos no meio líquido. Aplicado quando há a necessidade de clarificação de grande volume de

meio fermentado e a assepsia não é fator determinante (SCHMIDELL *et al.*, 2001). O meio líquido passa perpendicularmente por um meio filtrante, pela presença de pressão. O líquido que é capaz de atravessar o filtro é denominado filtrado e o material residual que fica depositado no filtro é a torta de filtração (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Alguns agentes, como a terra diatomácea, são utilizados para facilitar a filtração, sendo estes adicionados à suspensão inicial ou depositados sobre o meio filtrante. Esses agentes reduzem a compressibilidade da torta e evitam o entupimento do filtro. No entanto, é necessário saber se o agente pode ser recuperado no final do processo *downstream* (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O filtro mais utilizado em processos de clarificação é o FRV – Filtro rotativo a vácuo (Figura 9). Esse filtro é um tambor oco e rotativo coberto com uma malha metálica filtrante. A malha é coberta com terra diatomácea. O tambor fica parcialmente submerso na suspensão a ser filtrada. A suspensão é alimentada pela parte externa, e a filtração ocorre devido à pressão reduzida do interior do tambor (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Figura 9: Filtro rotativo à vácuo.



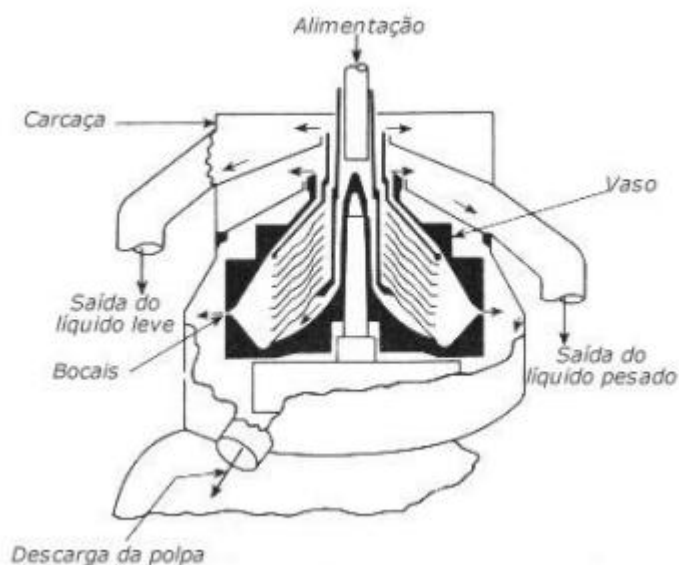
Fonte: VIEGAS, 2016.

3.3.1.2 Centrifugação

As células sofrem sedimentação por ação da força da gravidade em um meio líquido. A centrifugação é o método que acelera esse processo de sedimentação, por meio da ação da força centrífuga. Esse processo de clarificação é utilizado quando o meio fermentado é intolerante à adição de agentes de filtração ou quando o processo exige alta assepsia (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Os tipos mais comuns de centrífugas são a de disco (Figura 10) e as tubulares (Figura 11). As centrífugas de disco são as mais utilizadas em separações do tipo líquido-líquido, pois conseguem separar partículas bem finas de sólidos. O processo é contínuo e permite o tratamento de suspensões de até 250 g/L. A inclusão de mais discos permite uma maior área de sedimentação, reduzindo o tempo de processo (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

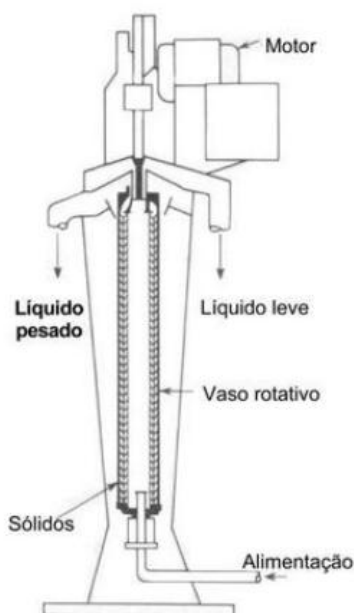
Figura 10: Esquema de uma centrífuga de discos com descarga por bocais.



Fonte: ALVES, 2006.

Já as tubulares podem funcionar com rotações bem elevadas e com refrigeração. No entanto, essas centrífugas atuam no modo descontínuo e com quantidades limitadas (máximo 30 g/L) (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Figura 11: Sistemática de uma centrífuga tubular.



Fonte: LIMA, 2019.

3.3.2 Rompimento Celular

Nos casos em que os produtos de interesse estão localizados dentro da célula, o processo de rompimento é adicionado logo após a clarificação, pois as células e o meio já estão separados, facilitando a purificação do produto. Os rompimentos celulares mais comuns são (SCHMIDELL *et al.*, 2001):

- Enzimático: as enzimas conseguem hidrolisar as paredes celulares (SCHMIDELL *et al.*, 2001).
- Homogeneizadores sob alta pressão: pistões projetados para aplicar altas pressões à suspensão celular, forçando a célula a passar por um orifício estreito seguido de uma colisão contra uma superfície. Pela súbita descompressão, as células rompem (SCHMIDELL *et al.*, 2001).
- Moinho de bolas: consiste em uma câmara de moagem com pequenas esferas e haste rotatória no centro. Agitadores de diferentes formatos estão presos na haste, transmitindo energia cinética às bolas, forçando-as a colidirem, rompendo as células (MACHADO JUNIOR, 2014).
- Ondas ultrassônicas: a ruptura celular ocorre devido à cavitação. Esse fenômeno libera ondas de choque altamente energéticas. As bolhas de

ar produzidas pelas forças de cisalhamento durante a cavitação movimentam as células menores de forma violenta até que ocorra o rompimento das mesmas. Já as células maiores sofrem *stress* cisalhante, causando rompimento sem a movimentação (MACHADO JUNIOR, 2014).

- Químicos: utilização de compostos químicos para o rompimento (ex: amônia, hidróxido de sódio, detergentes, dimetilsulfóxido e tolueno) (MACHADO JUNIOR, 2014).

3.3.3 Purificação de baixa resolução

Após a clarificação, há a separação das moléculas com características físico-químicas diferentes entre si. Substâncias com diferentes polaridades são separadas e o produto é consideravelmente concentrado. Essa purificação também é denominada como isolamento primário (ASSIS, 2014).

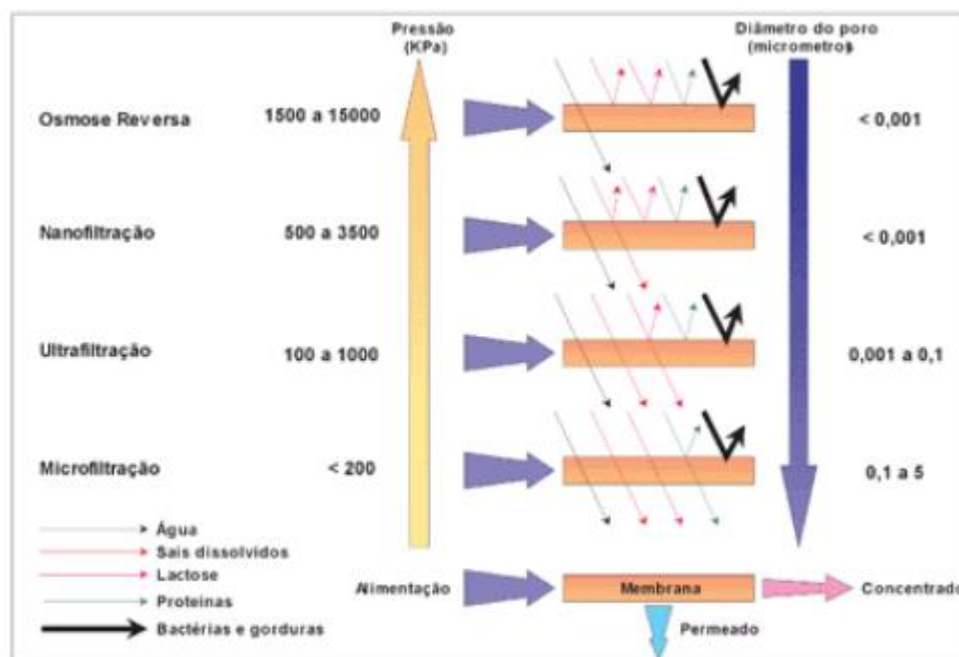
3.3.3.1 Precipitação

A precipitação baseia-se na solubilidade da molécula e nas interações que ela possui com o solvente. Não possui alta capacidade de separação, mas é um dos métodos mais tradicionais e de fácil operação (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

3.3.3.2 Separação por membranas

A separação por membranas pode ser dividida em várias classes, de acordo com o tamanho do poro e a pressão necessária para a passagem do filtrado. A Figura 12 contém um esquema geral de classificação de processos de separação de membranas (BRANCO, 2010).

Figura 12: Classificação de processos de separação de membranas em relação ao diâmetro do poro e a pressão.



Fonte: BRANCO, 2010.

3.3.3.2.1 Microfiltração

Processo mais próximo da filtração clássica. As membranas possuem poros na faixa de 0,1-10 μm . A microfiltração tem a função de remover materiais em suspensão e emulsões. Quando a solução passa pela membrana, a impureza fica retida no mesmo (TRINDADE, 2010).

3.3.3.2.2 Ultrafiltração

O sistema é parecido com a filtração convencional, mas os diâmetros dos filtros aplicados variam de 0,001 a 0,1 μm . Devido ao pequeno diâmetro, são usados em concentração de proteínas e polissacarídeos, devido ao tamanho superior em relação a outras moléculas presentes no meio fermentado (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O “diâmetro nominal de corte” corresponde ao tamanho do poro da membrana, referente à massa molecular mínima a ficar retida. As membranas não são uniformes, possuindo uma variação no tamanho dos poros. Sendo assim, o diâmetro nominal de corte deve ser 20% menor que a molécula de interesse (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Como a distribuição de tamanhos presentes em um meio fermentado não é uniforme, a utilização desta técnica não é muito utilizada na prática (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

3.3.3.2.3 Nanofiltração

As membranas de nanofiltração possuem poros menores que as membranas de ultrafiltração. É geralmente utilizada na separação de solutos orgânicos de baixo peso molecular (200- 2000 Da) e na desmineralização parcial de correntes líquidas para a remoção de sais polivalentes. Os mecanismos da nanofiltração são os de difusão, a exclusão molecular e as interações eletrostáticas (SILVA, 2020; STREIT, 2011).

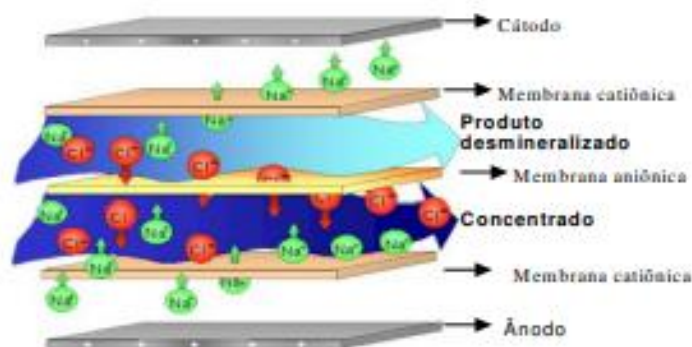
3.3.3.2.4 Osmose inversa

É um processo de separação por membranas, em que há a remoção de solutos de baixa massa molecular de uma solução. A membrana é semipermeável, permitindo que o solvente preferencialmente passe pela mesma. Osmose inversa remete à concentração da solução purificada, ao invés da solubilização (osmose) (BETTIOL, 2004).

3.3.3.2.5 Eletrodiálise

Método de separação por membranas trocadoras de íons (catiônicas e aniônicas). Essas membranas são dispostas entre o cátodo e o ânodo. Entre as membranas são colocados espaçadores, cuja função é causar fluxo turbulento. Os compartimentos formados permitem a circulação da solução alimentadora. Uma célula de eletrodiálise está representada na Figura 13. Há a aplicação de um campo elétrico entre os eletrodos. A solução sofre efeito desse campo elétrico e os cátions deslocam-se para o cátodo e os ânions para o ânodo (KOMESU, 2015; STREIT, 2011).

Figura 13: Esquema de uma célula de eletrodialise.



Fonte: STREIT, 2011.

3.3.3.3 Extração

3.3.3.3.1 Sistemas de duas fases aquosas (SBAs)

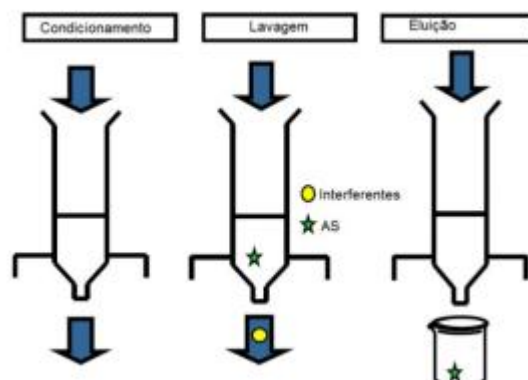
Esse processo de purificação de baixa resolução consiste em duas soluções aquosas não miscíveis. Há o contato entre o solvente extrator e a solução alimentadora, de modo que a molécula de interesse a ser extraída seja transferida da solução alimentadora para o solvente extrator. A tensão superficial dessas fases deve ser baixa, permitindo que as moléculas passem de uma fase para outra, de acordo com a afinidade. A extração não altera a estrutura da biomolécula (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Os sistemas constituídos de duas fases aquosas (SBAs) têm sido amplamente utilizados nos processos de purificação de enzimas e proteínas, pois são eficientes, ambientalmente seguros e economicamente viáveis. As duas soluções aquosas podem ser constituídas de diferentes combinações entre polímeros, sais, líquidos iônicos, solventes orgânicos e aminoácidos (SILVA, 2020).

3.3.3.3.2 Sistema em fase sólida (SPE)

Técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica. Os analitos da mistura ficam retidos na coluna que possui adsorvente. Um solvente seletivo passa pela coluna para eluir e remover os interferentes. Outro solvente é utilizado para retirar os analitos da coluna. O sistema em fase sólida está representado na Figura 14 (BELIVAQUA, 2013).

Figura 14: Sistema em fase sólida.



Fonte: BELIVAQUA, 2013.

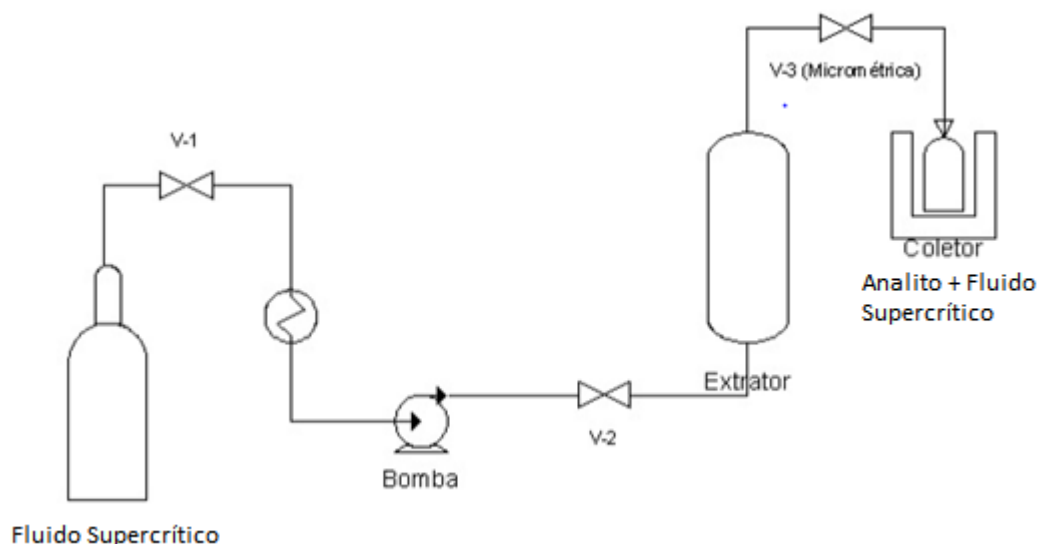
3.3.3.3 Flúídos supercríticos

Um fluído supercrítico é um estado de uma substância, em que se encontra na temperatura e pressão críticas. Por isso, esse fluido apresenta propriedades físico-químicas intermediárias entre líquido e gás. A densidade do fluido supercrítico é próxima a de líquidos, aumentando a capacidade de solvente do mesmo. A elevada difusividade e a baixa viscosidade facilitam a transferência de massa (SANTOS, 2011).

O fluído supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono. A temperatura crítica do CO_2 é baixa (próxima a $31,1^\circ\text{C}$), evitando a degradação de componentes termossensíveis. A pressão crítica não é difícil de ser obtida (73,8 bar). Além das características de temperatura e pressão crítica, outros motivos são: não é inflamável, inodoro, quimicamente inerte, o baixo custo e é encontrado em alta pureza (SANTOS, 2011).

No processo de extração utilizando esse fluido (Figura 15), o componente intermediário é solubilizado pelo fluido supercrítico, enquanto o componente de interesse é insolúvel. Para a solubilização de moléculas de maior polaridade, é necessário adicionar pequenas quantidades de co-solvente (geralmente metanol) para alterar as propriedades do fluido (SANTOS, 2011).

Figura 15: Processo de extração utilizando fluidos supercríticos.



Fonte: Adaptado de SANTOS, 2011.

3.3.4 Purificação de alta resolução

Separação da molécula de interesse das demais moléculas de características físico-químicas semelhantes. Ocorre a remoção de impurezas e a concentração do produto (ASSIS, 2014).

3.3.4.1 Cromatografia

A técnica mais aplicada em separação de bioprodutos é a cromatografia, devido a grande separação que é possível conseguir utilizando esse processo. Isso porque a especificidade obtida nesta técnica é alta, gerando um produto com elevado grau de pureza (ASSIS, 2014).

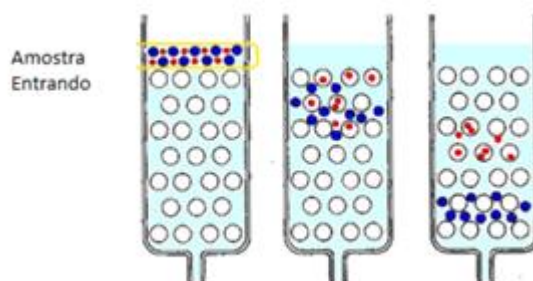
A cromatografia consiste em um sistema de duas fases: uma fase móvel (gasosa, líquida ou um fluído supercrítico) e uma fase estacionária (sólida ou líquida). O meio fermentado é eluido junto à fase móvel, passando pela fase estacionária. Os solutos de interesse são adsorvidos ou retidos na fase estacionária. A fase móvel é responsável por movimentar gradualmente os solutos da outra fase. A separação ocorre de acordo com a afinidade das moléculas com a fase estacionária, as moléculas de interesse acabam movimentando-se de modo singular em relação aos outros componentes do meio (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

3.3.4.1.1 Permeação em Gel ou Exclusão Molecular

A cromatografia de permeação em gel (GPC) (Figura 16) é uma técnica de separação baseada nos efeitos de exclusão. A exclusão ocorre devido à diferença na forma e/ou tamanho molecular, também chamada de cromatografia de peneira molecular. Outro efeito de exclusão ocorre em relação à diferença de carga iônica (cromatografia de exclusão iônica) (SOUSA, 2007).

Na cromatografia de exclusão por tamanho, os solutos maiores são eluidos da fase estacionária mais rapidamente. As moléculas menores entram e saem dos poros presentes na coluna, demorando mais para sair da fase estacionária (SOUSA, 2007).

Figura 16: Esquema de Cromatografia de Permeação em Gel.

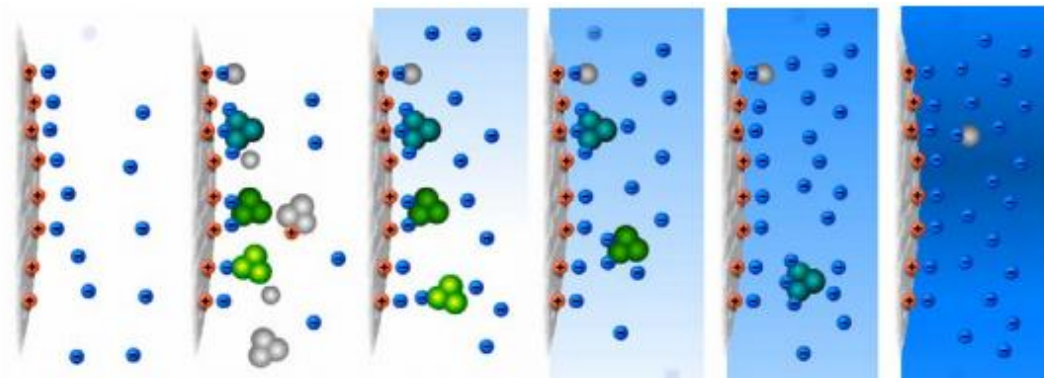


Fonte: ASSIS, 2014.

3.3.4.1.2 Troca Iônica

A cromatografia de troca iônica é baseada na afinidade entre uma fase estacionária eletricamente carregada e as cargas iônicas dos solutos (Figura 17). Os solutos com cargas contrárias à da fase estacionária ficam retidos, enquanto os íons de mesma carga eluem mais rapidamente. A adsorção que ocorre nesse processo é reversível e os íons retidos são substituídos por íons de uma fase móvel que possuem maior afinidade com a fase estacionária. Portanto, o grau de afinidade eletrostática entre a fase estacionária e os íons da fase móvel possibilita o processo de cromatografia. A separação pode ser controlada pela alteração de pH e pela força iônica (MEDEIROS, 2008).

Figura 17: Mecanismo de cromatografia de troca iônica.



Fonte: MEDEIROS, 2008.

3.3.4.2 Destilação

É uma operação unitária usada para separar os componentes de uma solução líquida, de acordo com a distribuição dos mesmos (fase vapor e líquida) ao aquecer a solução alimentadora a uma temperatura escolhida.

3.3.4.2.1 Destilação Simples

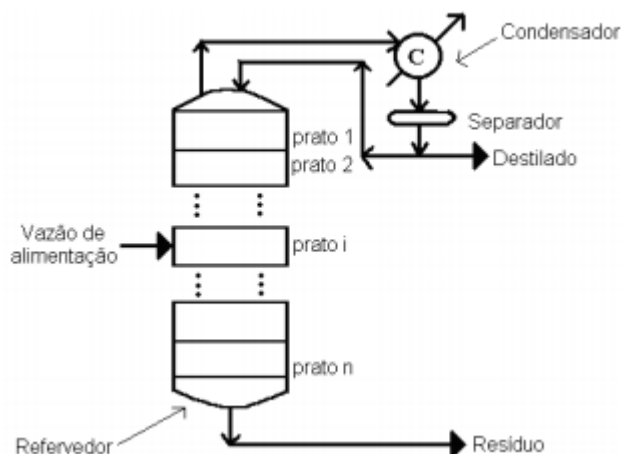
O processo de destilação simples consiste em uma etapa de vaporização e uma de condensação. A solução é aquecida e o vapor gerado é imediatamente resfriado no condensador. O líquido condensado é o destilado (OPPE, 2008).

3.3.4.2.2 Destilação Fracionada

A destilação fracionada (Figura 18) possui como fator diferencial a presença de uma coluna. A solução alimentadora é aquecida no refeedor formando um vapor que vai subindo pela coluna. O vapor condensa-se à medida que sobe, e começa a descer novamente na forma de líquido. Esse líquido encontra-se com os vapores gerados continuamente pelo refeedor, trocar calor com os mesmos e volta a ser vapor (OPPE, 2008).

Assim, o ciclo de vaporização e condensação ocorre diversas vezes ao longo da coluna. Na coluna, vários obstáculos são colocados para que o líquido e o vapor sejam forçados a trocar calor. Um maior número de estágios (pratos) de vaporização-condensação e uma área maior de contato no interior da coluna proporciona uma separação melhor, resultando em um produto mais purificado (OPPE, 2008).

Figura 18: Destilação Fracionada.



Fonte: OPPE, 2008.

3.3.4.2.3 Destilação Azeotrópica

A destilação azeotrópica consiste na destilação convencional com um terceiro componente (agente de arraste). É utilizado em casos que há formação de azeótropo nos componentes da mistura. Esse novo componente tem a finalidade de formar um novo azeótropo com um dos componentes da solução alimentadora. Esse novo azeótropo deve proporcionar uma mistura heterogênea, com a formação de duas fases líquidas. O novo azeótropo é removido como produto de topo ou de base, dependendo do tipo de azeótropo (de mínimo ou de máximo). O outro componente da mistura é obtido puro na extremidade oposta do azeótropo. Uma segunda coluna deve ser utilizada para recuperação do componente de arraste (BRITO, 1997).

3.3.4.2.4 Destilação Extrativa

A destilação extrativa é uma alternativa para a separação de misturas azeotrópicas. Há a adição de um terceiro componente (chamado de solvente) que possui a função de alterar a volatilidade relativa dos componentes originais. Nessa destilação, o solvente não pode formar um novo azeótropo e nem pode haver separação de fases (BRITO, 1997).

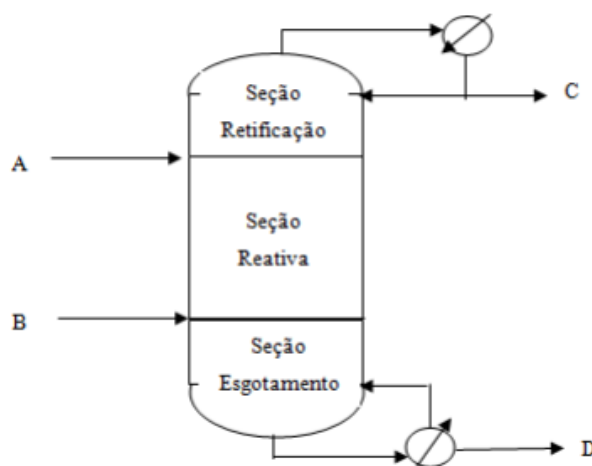
A escolha do solvente determinará as correntes de saída do sistema. O caso convencional é que o componente mais volátil seja removido no topo, enquanto o solvente e o componente intermediário são recolhidos como

produto de fundo. Há casos em que o solvente é o componente mais volátil, e, portanto é direcionado ao topo da coluna, junto ao componente intermediário. E outro método ocorre quando o componente intermediário é recolhido no topo da coluna, enquanto o produto de interesse e o solvente são recolhidos na base da coluna. Em todos os casos, há a necessidade de uma segunda coluna para recuperação do solvente (BRITO, 1997).

3.3.4.2.5 Destilação Reativa

O processo consiste em uma destilação com reação na mesma operação unitária. À medida que os produtos são formados, eles são separados por destilação. Um modelo de processo de destilação reativa está representado na Figura 19. As seções de retificação e esgotamento são responsáveis pela separação, enquanto a seção reativa é pela reação (BRETAS, 2020).

Figura 19: Destilação Reativa.



Fonte: BRETAS, 2020.

Os componentes A e B devem ser alimentados na seção reativa, de modo que o reagente mais volátil seja alimentado no fundo, enquanto o reagente menos volátil no topo. Os reagentes A e B reagem em fase líquida, de forma reversível (BRETAS, 2020).

Ao longo da reação, o produto C (mais volátil) é direcionado para a seção de retificação. Há um condensador na saída e a corrente de saída será

dividida em duas: uma delas retorna a seção de retificação e a outra sai como produto com alto grau de pureza (BRETAS, 2020).

Já o produto D (menos volátil) é direcionado para a seção de esgotamento. A corrente líquida passa por um refulvador e é dividida em duas correntes: uma que volta para a coluna (forma de vapor) e a outra como produto de fundo (rico em D) (BRETAS, 2020).

3.3.5 Tratamentos Finais

Processos utilizados para estabilizar e adequar o acondicionamento do produto. Os produtos devem estar puros, secos, cristalinos ou amorfos. Também chamado de isolamento final, são compostos de processos que fornecem a formulação final (comercial) do produto (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

3.3.5.1 Liofilização

A liofilização consiste na remoção de um solvente por sublimação. O produto que chega a essa etapa é congelado e depois submetido a baixa pressão. Com isso, o solvente (geralmente água) sublima, resultando em um pó (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

3.3.5.2 Cristalização

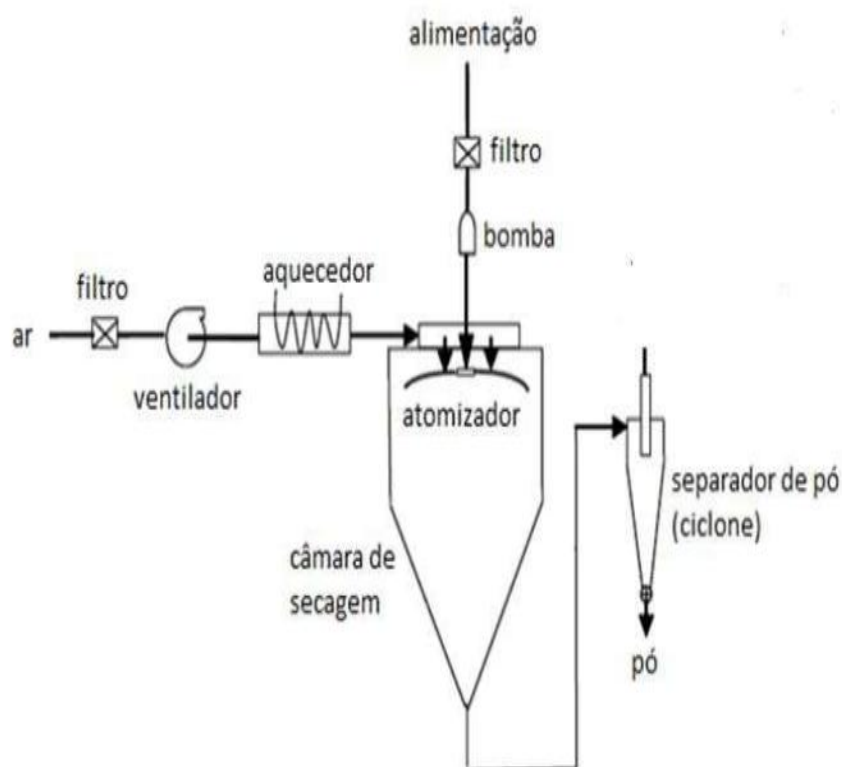
A cristalização consiste na formação de cristais agregados presentes nas soluções supersaturadas homogêneas. O grau de pureza determina se há ou não interferentes capazes de cristalizar junto ao produto. A estocagem é estável, sendo utilizada em purificação de proteína. Para recuperar o produto, o cristalizado deve ser submetido à filtração ou centrifugação seguido de secagem (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O grau de cristalização pode ser separado em três zonas. A primeira ocorre quando há uma concentração muito baixa de saturação, em que não há possibilidade de nucleação ou crescimento do cristal. Na segunda zona (metaestável supersaturada) há o crescimento de cristais, mas a nucleação não acontece. Já na terceira zona, os núcleos são formados espontaneamente.

3.3.5.3 Secagem por *spray drying*

O *spray drying* é uma operação unitária cuja função é retirar a umidade do produto através do fornecimento de energia térmica. Inicialmente, a solução alimentadora é atomizada, formando um *spray* (pequenas gotículas), de modo a aumentar a área superficial a ser seca. Em seguida, o *spray* entra em contato com um ar quente na câmara de secagem, e assim a água contida na alimentação é evaporada. O pó formado passa por um ciclone que separa o pó de acordo com o tamanho desejado. O processo de secagem está representado na Figura 20 (GEANKOPLIS, 2003).

Figura 20: Secagem por Spray Drying.



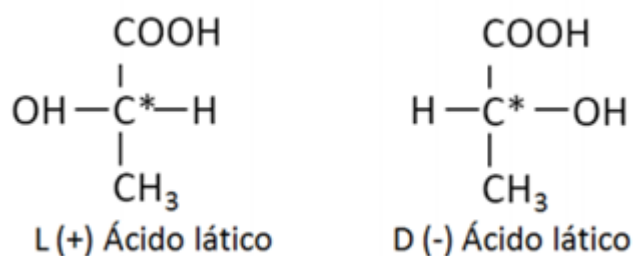
Fonte: CHEN, 2009.

4. DOWNSTREAM EM PROCESSOS UTILIZANDO BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS

4.1 Produção de Ácido Lático

O ácido láctico (ácido 2-hidróxipropiônico ou ácido α -hidróxipropiônico) é o ácido mais abundante da natureza. Esse ácido possui 2 isômeros ópticos, devido à presença de um carbono quiral em sua estrutura (Figura 21). O ácido láctico é solúvel em água e em solventes orgânicos miscíveis em água (XAVIER, 2011).

Figura 21: Isômeros ópticos do ácido láctico.

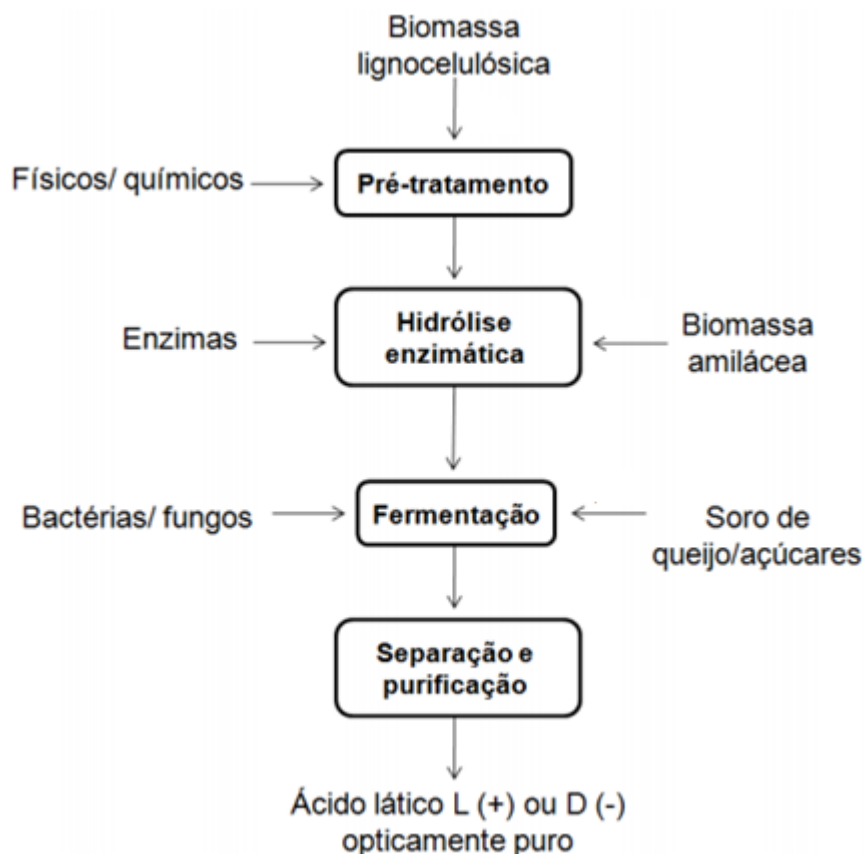


Fonte: XAVIER, 2011.

O ácido láctico é bastante utilizado na produção de bebidas (ajuste de pH), na formulação de salmouras (para azeitonas e pepino). É usado na produção de loções para pele, sendo assim um produto de interesse da indústria farmacêutica e de cosméticos. (RODRIGUES, 2012).

A maior parte da produção de ácido láctico ocorre por meio de fermentação bacteriana (90% da produção mundial). O restante é produzido por via química (hidrólise do lactonitrilo) (XAVIER, 2011). As diferentes rotas de produção de ácido láctico por meio de fermentação estão representadas na Figura 22.

Figura 22: Rotas fermentativas do ácido lático.



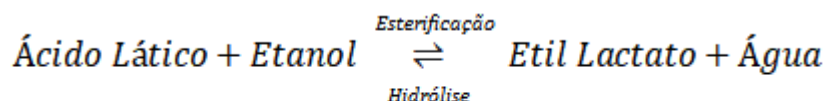
Fonte: XAVIER, 2011.

Daful e Görgens (2017) realizaram um estudo de análise técnico-econômico e avaliação do impacto ambiental da produção de ácido lático lignocelulósico (bagaço de cana-de-açúcar). O *downstream* escolhido para a purificação do ácido lático foi a destilação reativa. O reagente escolhido foi o etanol, pois os autores acham interessante a ideia desse tipo de purificação em uma biorrefinaria integrada (coprodução de ácido lático e etanol).

Inicialmente, o ácido lático reage com o etanol formando etil lactato (esterificação). Desta forma, o etil lactato é mais facilmente separado por destilação (como produto de topo), enquanto as impurezas e os ácidos orgânicos pesados são coletados como produtos de base. Depois, o etil lactato é hidrolisado em um segundo destilador reativo. O ácido lático é coletado na parte inferior, enquanto o etanol e a água são coletados na parte superior. As reações estão representadas na Figura 23. Por fim, o etanol é separado da

água por destilação normal e o mesmo é reciclado para seguir com outra reação de esterificação.

Figura 23: Reações de esterificação e hidrólise.



Fonte: Adaptado de Dazel & Görgens (2017).

Tong *et al.* (2004) utilizaram a técnica de troca iônica como purificação de ácido láctico produzido a partir de lodo de papel. Os autores fizeram o uso do trocador aniônico fraco Amberlite IRA-92. No estudo, eles avaliaram a taxa de fluxo, volume de amostra, o pH e a coluna para encontrar o melhor resultado. O rendimento, a pureza e a produtividade foram de 82,6%, 96,2% e 1,16 g ácido láctico/ (g de resina x dia) após a otimização do processo.

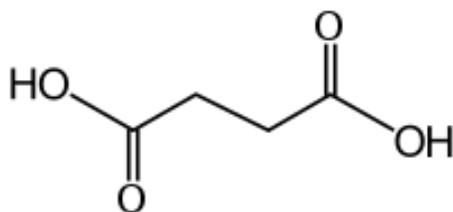
Oonkhanond *et al.* (2017) fizeram uso de nanofiltração para purificar o ácido láctico produzido por fermentação, o bagaço de cana-de-açúcar foi o substrato lignocelulósico do estudo. Inicialmente, o fermentado foi filtrado com microfiltro para remover as células presentes. Em seguida, o filtrado (contendo apenas ácido láctico e glicose) passou por um nanofiltro do tipo M-N1812A5. A porcentagem de retenção da glicose foi de 84% e a do ácido láctico foi de apenas 15%.

Xu, S. *et al.* (2018) utilizaram a extração de duas fases aquosas como *downstream* do processo. O ácido láctico foi obtido por meio da fermentação da palha do milho. As duas fases utilizadas foram 1,4-dioxane e sulfato de sódio. A técnica possibilitou a extração de 90% do ácido láctico que havia no fermentado.

4.2 Produção de Ácido Succínico

O ácido succínico (AS) é um ácido dicarboxílico que se encontra sólido a temperatura ambiente e possui elevado ponto de ebulição (235°C) (ANDRADE, 2017). A fórmula estrutural do AS encontra-se na Figura 24.

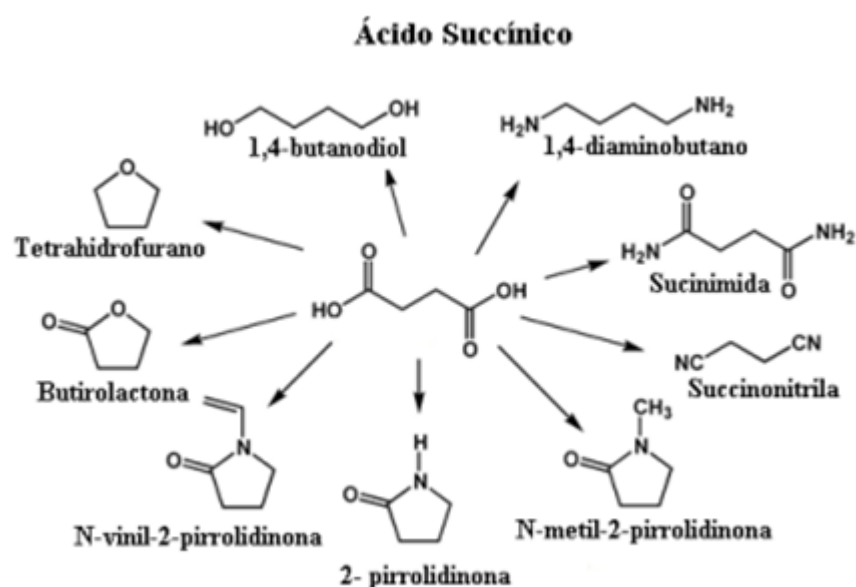
Figura 24: Estrutura química do ácido succínico.



Fonte: ANDRADE, 2017.

O AS é conhecido por ser o precursor de diversos compostos da indústria química (Figura 25). Este composto também é utilizado como agente aromatizante na indústria alimentícia (BELIVAQUA, 2013).

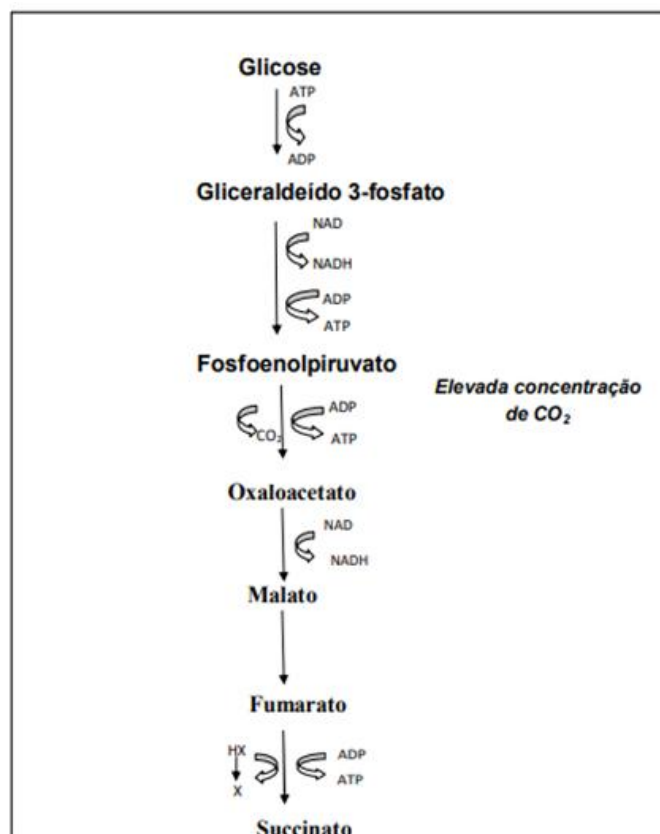
Figura 25: Compostos químicos produzidos a partir do ácido succínico.



Fonte: BELIVAQUA, 2013.

A síntese de ácido succínico por fermentação ocorre em elevadas concentrações de CO_2 , representada pela Figura 26.

Figura 26: Via metabólica de ácido succínico em elevadas concentrações de CO_2 .



Fonte: BELIVAQUA, 2013.

Belivaqua (2013) realizou um estudo de recuperação do AS utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE). A autora fez uso de cartuchos com fases extratoras diferentes, mas apenas cartucho de troca iônica foi eficiente na recuperação de AS (até 96,0%). Os eluentes utilizados foram metanol e água modificados com 10% de ácido fórmico. Após a extração em fase sólida, a fase de eluição foi cristalizada em liofilizador à -44°C por 24 horas. A amostra liofilizada apresentou pureza de 80,7%. Esse estudo baseou-se na produção biotecnológica de AS a partir da casca de aveia (material lignocelulósico).

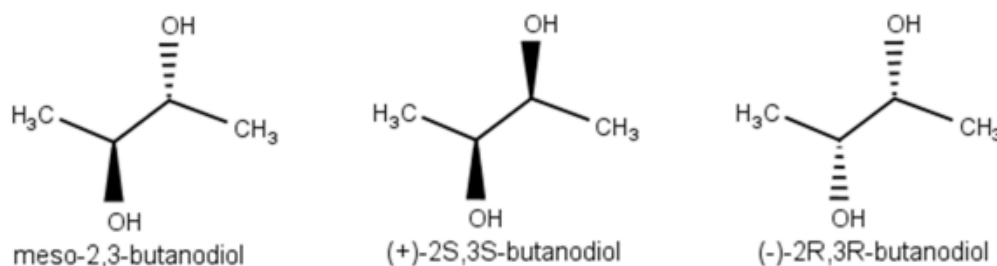
Law *et al.* (2019), em seu estudo com bagaço de folha de dendê, recuperaram o AS utilizando carvão ativado, osmose direta e cristalização. Inicialmente, o caldo de fermentação foi centrifugado por 20 min a 8000 rpm para remoção de células. Depois, o caldo foi tratado com carvão ativado em pó, para remover a glicose residual e clarificar o caldo. Diferentes concentrações

de carvão ativado foram adicionadas e os frascos ficaram sob agitação (200 rpm) durante 24 horas. Após o tratamento, o caldo foi centrifugado para retirar o carvão e filtrado à vácuo para confirmar que não haveria partículas suspensas no caldo. Para a osmose direta, foi utilizada a membrana assimétrica CTA e um sistema de fluxo cruzado. A solução de alimentação (água purificada) e o DS (cloreto de sódio a 5 M) foram circulados em cada canal da célula em contracorrente. Para o caldo clarificado, o processo de osmose direta foi avaliado durante 12 horas e em 14 horas. Os autores conseguiram concentrar de 28,88 g/L para 111,26 g/L. O pH do caldo fermentado obtido da técnica de osmose direta foi ajustado a 2, por meio de adição de ácido sulfúrico. O AS foi cristalizado a 4°C com agitação de 150 rpm por 24 horas. Após a cristalização, os cristais de AS foram filtrados e lavados com água purificada gelada. Por fim, os cristais obtidos foram secos por 24 horas com uma temperatura de 50°C. A pureza e o rendimento de AS foram de 90,52% e 67,09%, respectivamente.

4.3 Produção de 2,3-Butanodiol

O 2,3-butanodiol (2,3-BDO) está presente, em pequenas quantidades, nos tecidos vegetais. O 2,3-BDO é um diálcool e possui três estereoisômeros diferentes, representados na Figura 27 (SILVA,2020):

Figura 27: Estereoisômeros do composto 2,3-butanodiol.

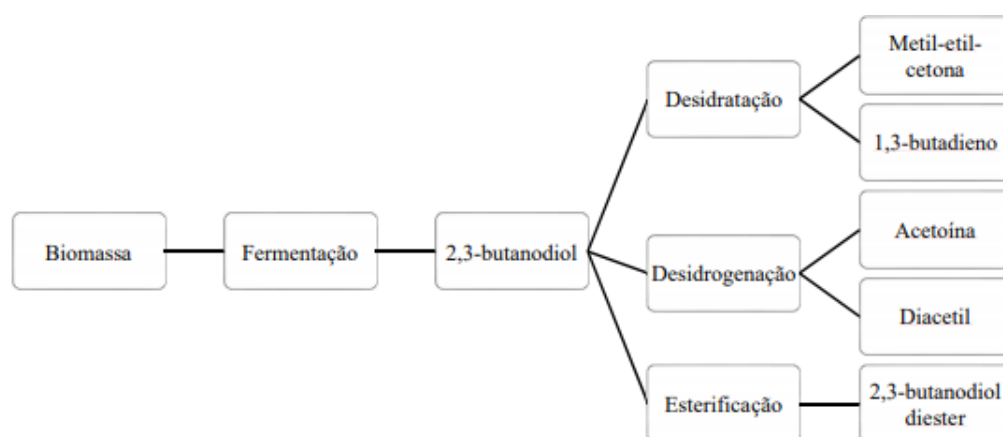


Fonte: SILVA, 2020.

O 2,3-BDO é um precursor de vários produtos na indústria, sendo considerado um intermediário químico de grande potencial. O 2,3-BDO quando convertido em butanona (metil-etil-cetona) pode ser utilizado como aditivo de combustível. Por meio de desidratação, o 2,3-BDO pode ser convertido a 1,3-

butadieno, utilizado na produção de borracha sintética. O 2,3-butanodiol diester é um composto resultante de esterificação do 2,3-BDO, que é necessário para a fabricação de espumas de poliuretano, bastante usadas pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. A acetoína e o diacetil são dois aromas de alto valor agregado, produzidos pela desidrogenação do 2,3-BDO. A Figura 28 representa de maneira simplificada a síntese desses compostos. Ainda, o estéreo isômero (+)-2S,3S-butanodiol é utilizado como anticongelante, devido ao seu baixo ponto de fusão (próximo à -60°C) (GARCIA, 2006; SILVA, 2020).

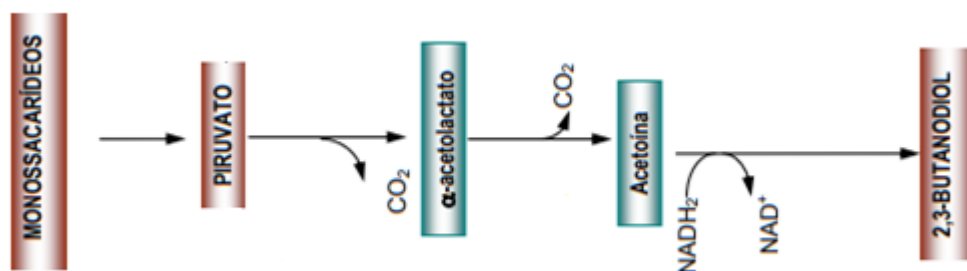
Figura 28: Esquema da síntese de compostos químicos derivados do 2,3-butanodiol.



Fonte: SILVA, 2020.

A produção de 2,3-BDO por meio da fermentação da biomassa está representada no esquema da Figura 29.

Figura 29: Via metabólica da formação de 2,3-butanodiol por meio de fermentação.



Fonte: Adaptado de Garcia (2006).

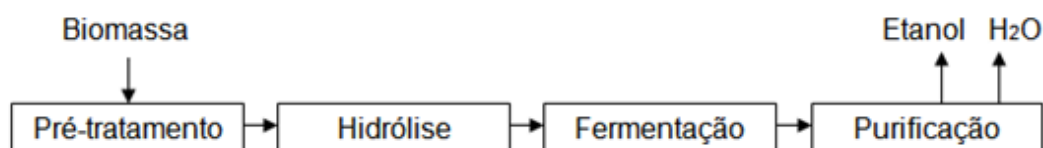
A maior dificuldade desse processo de produção de 2,3-BDO (e de tantos outros processos) é a recuperação do produto final. As dificuldades dessa recuperação se dão pelo elevado ponto de ebulição (180 – 184°C) e pela grande afinidade com a água (GARCIA, 2006).

Garcia (2006), em sua tese utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, recuperou o 2,3-BDO por meio da técnica de *salting-out*. Inicialmente, a autora centrifugou o meio para remover as células presentes. Depois realizou alguns experimentos em tubos de ensaio, adicionando meio e diferentes concentrações de carbonato de potássio (K_2CO_3), avaliando diferentes temperaturas. De acordo com o modelo, a recuperação de 2,3-BDO pode atingir um valor de 92%.

4.4 Produção de Etanol de segunda geração

O etanol de segunda geração (2G), conhecido também como etanol celulósico, pode ser feito a partir do bagaço de cana-de-açúcar, sorgo, milho, beterraba, entre outros. O etanol 2G é, em sua grande parte, utilizado como combustível, sendo considerado um “combustível limpo”. O processo de obtenção de etanol 2G a partir da biomassa está representado na Figura 30 (MARTINS, 2014).

Figura 30: Fluxograma de produção de etanol de segunda geração.



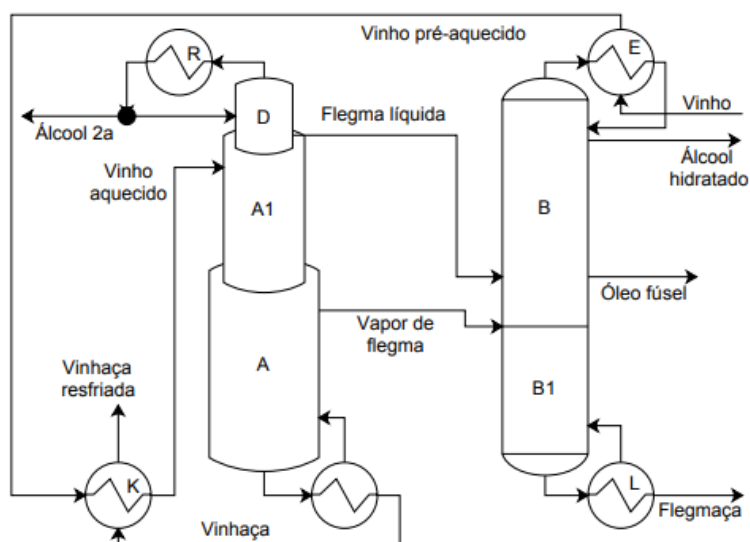
Fonte: MARTINS, 2014.

Todo processo de destilação alcoólica inicia-se com a concentração de vinho. O vinho produzido pela fermentação passa por duas centrífugas que separam as células do vinho. O vinho sem o agente biológico possui concentração de etanol entre 7 e 10% em massa. Esse vinho é conduzido para o processo de destilação (obtenção de álcool etílico hidratado combustível – AEHC), e posteriormente para a desidratação (obtenção de álcool etílico anidro combustível – AEAC). O AEHC é o álcool obtido na proporção próxima ao

ponto azeotrópico (entre 92,6% e 93,8% em massa), enquanto o AEAC é uma mistura de etanol-água obtida acima desse ponto (mínimo 99,3% em massa) (CARPIO, 2019, ROCHA, 2015).

A configuração mais tradicional em um sistema de destilação industrial é conhecida como configuração AA1D-B1B. O processo simplificado (Figura 31) consiste em cinco colunas divididas em dois blocos: coluna de destilação e conjunto de retificação (CARPIO, 2019, ROCHA, 2015).

Figura 31: Fluxograma de processo de destilação de AEHC.



Fonte: CARPIO, 2019.

O vinho é aquecido de 30°C a 60°C em um primeiro trocador de calor E, depois é aquecido novamente em um segundo trocador de calor K até aproximadamente 93°C. O vinho aquecido entra pelo topo da coluna A1 (coluna de depuração do vinho, contendo 8 pratos). Os vapores produzidos são fonte de alimentação no fundo da coluna D, enquanto o produto de fundo (vinhaça) vai para a coluna A (CARPIO, 2019, ROCHA, 2015).

A coluna A (possui entre 16 e 24 pratos) tem a função de purificar a vinhaça. Parte do vapor produzido retorna para a coluna A1. A outra parte é o vapor de flegma (teor alcoólico em torno de 40% em massa) que é alimentado no fundo da coluna B. A vinhaça produzida deve possuir teor alcoólico da

ordem de 0,02% em massa. Quando atinge esse teor alcoólico, a vinhaça é resfriada no trocador de calor K, sendo responsável pelo aquecimento do vinho (CARPIO, 2019, ROCHA, 2015).

A coluna D (coluna de concentração de álcool de segunda - 6 pratos) é responsável por concentrar os produtos mais voláteis do vinho. O vapor obtido é condensado no trocador de calor R e a corrente líquida é dividida em duas correntes: uma retorna à coluna (reciclo) e a outra é retirada como álcool de segunda (etanol e compostos voláteis, conferindo pH ácido). O produto de fundo obtido na coluna D (flegma líquida) é alimentado no fundo da coluna B (CARPIO, 2019, ROCHA, 2015).

Na coluna B (40 pratos), todo o vapor produzido no topo da coluna é condensado no trocador de calor E e reciclado para a coluna B. Esses vapores servem para pré-aquecer o vinho. O AEHC é retirado como uma saída lateral líquida (um prato abaixo do topo da coluna). Em uma saída próxima ao fundo da coluna, o óleo fúsel (água, etanol e álcoois de cadeia longa) é extraído. O produto de fundo da coluna B é alimentado no topo da coluna B1 (CARPIO, 2019).

Na coluna B1 (13 pratos), o vapor produzido retorna para a coluna B. Enquanto o produto de fundo (flegmaça) é direcionado para um trocador de calor L. Caso o teor alcoólico da flegmaça seja maior que 0,02%, a flegmaça retorna para a coluna B1 (CARPIO, 2019, ROCHA, 2015).

A energia é fornecida aos destiladores A e B1 por meio de vapores de baixa pressão, utilizando trocadores de calor (CARPIO, 2019, ROCHA, 2015).

O conjunto das três primeiras colunas (AA1D) é conhecido como sistema de lavagem do etanol, enquanto que o conjunto das duas últimas colunas (B1B) é conhecido como sistema de purificação do etanol (ROCHA, 2015).

Para a obtenção de AEAC, o AEHC produzido é conduzido a um processo de desidratação. Os principais métodos utilizados na indústria são: destilação azeotrópica, destilação extrativa utilizando solventes orgânicos e adsorção em peneiras moleculares (CARPIO, 2019).

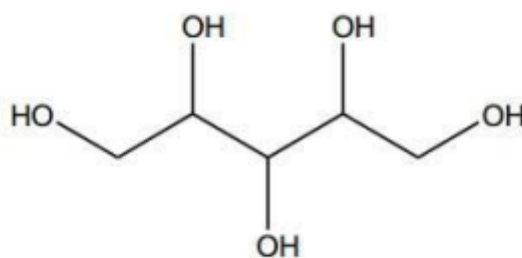
fundo dessa coluna é o extrator regenerado, que é misturado com líquido extrator de reposição e é reciclado para a coluna de extração (CARPIO, 2019).

Na adsorção com peneiras moleculares é utilizado três leitos de zeólitas que absorvem a água presente no AEHC, produzindo AEAC. O álcool hidratado deve ser vaporizado e alimentado às peneiras moleculares. Um dos leitos deve estar sempre em regeneração (retirada da água acumulada), por meio de uma bomba à vácuo aplicado ao leito. Os vapores obtidos (solução hidroalcoólica) são destinados a uma unidade de destilação convencional (CARPIO, 2019).

4.5 Produção de Xilitol

O xilitol é um poliol de cinco carbonos (Figura 33) e possui potencial adoçante semelhante ao da sacarose. Como o xilitol não precisa da insulina para ser metabolizado, esse poliol é um substituto do açúcar para pacientes com diabetes. Além disso, possui dois terços das calorias comparado à sacarose (ALVES, 2018).

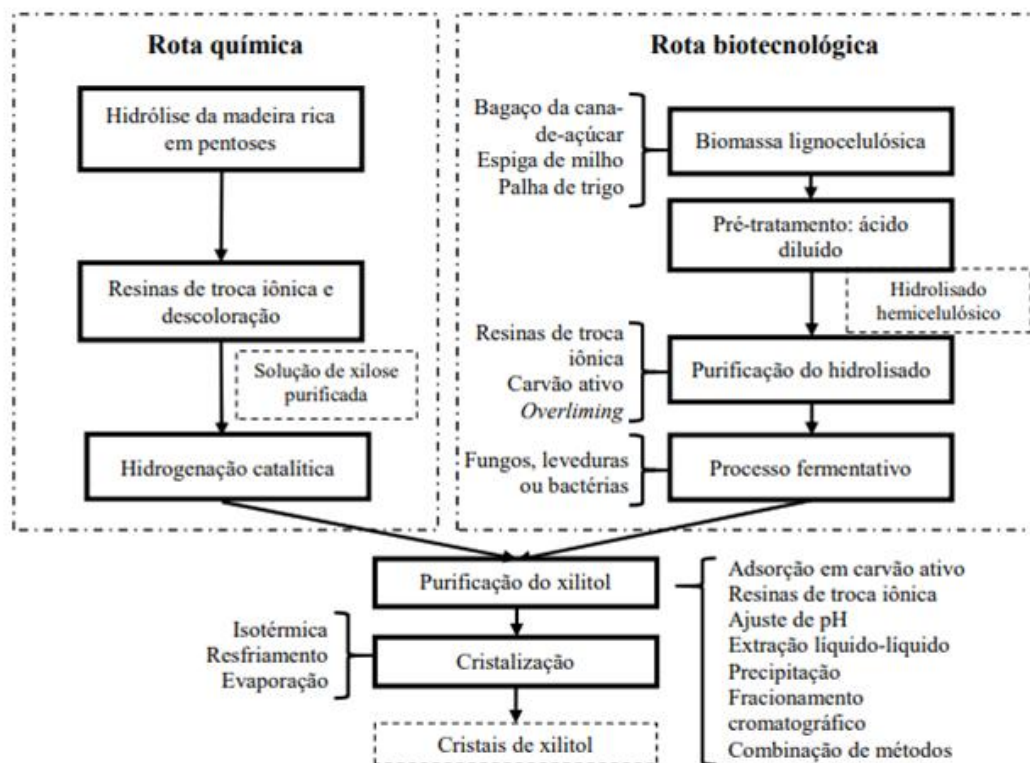
Figura 33: Fórmula estrutural do xilitol.



Fonte: FRANÇOSO, 2015.

Este poliol está presente em algumas frutas e vegetais (morango, ameixa amarela, couve-flor). No entanto, pela baixa quantidade presente e pela dificuldade de extração, a rota química e a rota biotecnológica de produção são mais interessantes para o mercado. Essas rotas estão exemplificadas na Figura 34.

Figura 34: Rotas químicas e biotecnológicas da produção de xilitol.



Fonte: ALVES, 2018.

Dentre os materiais lignocelulósicos que podem ser utilizados na produção de xilitol, pode-se citar: bagaço de cana-de-açúcar (ALVES, 2018), palha de trigo (CANILHA, 2006), casca de aveia (TAMANINI et al., 2004), entre outros.

O custo da purificação de xilitol biotecnológico pode ser superior ao custo de produção do mesmo. Sendo assim, devem-se estudar as melhores técnicas para viabilizar o processo (ALVES, 2018).

Canilha (2006) centrifugou e clarificou o meio fermentado utilizando resinas de troca iônica (catiônica e aniônica). Após a clarificação, a autora concentrou a solução utilizando um evaporador a vácuo, e por fim, cristalizou utilizando a técnica de solubilidade de xilitol em água e depois em etanol, variando de 60°C até a temperatura de saturação.

Rivas *et al.* (2006) utilizou carvão ativado para purificar o licor de fermentação e depois concentrou e cristalizou o xilitol da mesma forma que a autora Canilha (2006) realizou.

Alves (2018) realizou diversos experimentos com nanofiltração, possibilitando a remoção de 84% de proteínas e 96% de turbidez, o que contribui para a formação de cristais homogêneos nas etapas posteriores de purificação.

Santos *et al.* (2011) propuseram uma alternativa ao processo de purificação de xilitol, fazendo o uso da tecnologia de fluidos supercríticos. Os autores empregaram CO₂ como fluido supercrítico e etanol como co-solvente em seus experimentos.

Mussatto *et al.* (2006) estudaram a purificação de xilitol por meio da técnica de adsorção em sílica gel. Os autores utilizaram diferentes misturas de solventes (acetato de etila, etanol e acetona) como eluentes das colunas.

Silva *et al.* (2020) recuperaram o xilitol produzido por meio de uma série de procedimentos. Primeiramente, o caldo fermentado foi centrifugado duas vezes. Depois, o sobrenadante foi submetido a uma sequência de filtro de papel e microfiltros. O filtrado foi então concentrado utilizando-se um rotaevaporador e depois estocado em um freezer (-20 °C). Por último, o xilitol foi recuperado por meio da extração supercrítica. Nesse estudo, o fluido supercrítico foi o CO₂, e os autores optaram pelo etanol como co-solvente.

5. CONCLUSÃO

Devido ao alto valor requerido e a sua variedade de métodos, o processo *downstream* é considerado um ponto chave do sucesso de um projeto industrial. Cada bioproduto pode ter diversos tipos de processos *downstream*, cabe ao projetista analisar qual é a melhor opção ou combinação. Adequar um processo existente é, muitas vezes, necessário, para que o rendimento seja satisfatório e o projeto seja rentável.

O foco desta revisão foi relatar os processos gerais de purificação e dar um direcionamento para a pessoa que está procurando uma ideia inicial para o projeto. A diversidade de produtos obtidos por meio de materiais lignocelulósicos é grande, e como visto anteriormente, cada bioproduto por ter diferentes processos *downstream*. Recomenda-se que o responsável realize um projeto piloto (em escala de laboratório), e após o sucesso do projeto ocorra a ampliação para escala industrial.

Mesmo com a variedade de etapas *downstream* presentes na literatura, ainda há a busca por processos que não influenciem tanto na economia global do processo. A redução desse custo seria possível com o investimento em novas pesquisas por parte do governo e empresas privadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, T. L. **Produção biotecnológica de xilitol a partir do hidrolisado de bagaço de caju**. 2014. 148 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, UFCE, Fortaleza, 2014. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/10824>. Acesso em 12 dez. 2020.

ALMEIDA, J. M. A. R. **Conversão catalítica de biomassa lignocelulósica assistida por micro-ondas para a produção de álcoois de açúcar**. 2017. 136 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química, UFRG, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://epqb.eq.ufri.br/download/conversao-catalitica-de-biomassa-lignocelulosica-assistida-por-micro-ondas.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2021.

ALVES, A. F. **Separação de leveduras de fermentação alcoólica em hidrociclones**. 2006. 184 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, UFU, Uberlândia, 2006. Disponível em: <http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15119/1/AFAlves1DISSPRT.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2021.

ALVES, Y. P. **Produção e purificação de xilitol a partir de bagaço da cana-de-açúcar utilizando nanofiltração**. 2018. 128 p. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2018. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/337451>. Acesso em: 07 dez. 2020.

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**, Madrid, v.101, p.4851–4861, 2010.

ANDRADE, F. R. M. **Bioprodução de Ácido Succínico a partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Sorgo Sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]**. 2017. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) –

Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <http://186.202.79.107/download/bioproducao-de-acido-succinico-a-partir-de-bagaco-de-sorgo-sacarino.pdf>. Acesso em: 05 out. 2020.

ASSIS, I. P. **Downstream de biomoléculas de alto valor agregado: Enzimas amilolíticas e antibióticos β -lactâmicos**. 2014. 46 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Escola de Engenharia de Lorena, USP, Lorena, 2014. Disponível em: <https://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/monografias/2014/MBI14021.pdf>. Acesso em: 13 de nov. de 2020.

BELIVAQUA, D. B. **Produção biotecnológica de Ácido Succínico a partir de casca de arroz**. 2013. 124 p. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, UFSM, Rio Grande do Sul, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/4260>. Acesso em: 23 nov. 2020.

BETTIOL, V. R. **Estudo da influência do ClO_2 sobre membranas de poliamida para osmose inversa**. 2004. 123 p. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, UFRGS, Porto Alegre, 2004. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/6804>. Acesso em: 25 nov. 2020.

BRANCO, R. F. **Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de regeneração de coenzima como alternativa às vias química e microbiológica de obtenção**. 2010. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, USP, Lorena, 2010. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-25102012-133001/en.php>. Acesso em: 25 mar. 2021.

BRETAS, A. S. **Processo de obtenção de acetato de metila por destilação reativa**. 2020. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2020. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/353204>. Acesso em: 10 jan. 2021.

BRITO, R. P. **Processo de Destilação Extrativa: Modelagem dinâmica, simulação e avaliação de nova configuração**. 1997. 202 p. Tese (Doutorado

em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 1997. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/267354>. Acesso em: 13 dez. 2020.

CANILHA, L. **Produção de xilitol no hidrolisado de palha de trigo**. 2006. 153 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, USP, Lorena, 2006. Disponível em: <https://www.sapili.org/subir-depois/dplivros/cp008459.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2020.

CARPIO, R. R. **Otimização do processo de produção de etanol de segunda geração em um sistema integrado à primeira geração**. 2019. 225 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Roymel-Rodriguez-Carpio/publication/333701634_PROCESS_OPTIMIZATION_OF_SECOND_GENERATION_ETHANOL_PRODUCTION_INTEGRATED_WITH_A_FIRST_GENERATION_SYSTEM/links/5cffcae792851c874c5e829e/PROCESS-OPTIMIZATION-OF-SECOND-GENERATION-ETHANOL-PRODUCTION-INTEGRATED-WITH-A-FIRST-GENERATION-SYSTEM.pdf. Acesso em: 12 jan. 2021.

CHEMMES, C. S. et al. Estudos de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de etanol de segunda geração. **Revista Unifacs**, 2013. Disponível em: <https://revistas.unifacs.br/index.php/sepa/article/view/2816/2044>. Acesso em: 23 mar. 2021.

CHEN, X. D.; MUJUMDAR, A. S. **Drying Technologies in Food Processing**, 2. ed. Nova Jersey: Wiley, 2009, p. 352.

CRUZ, J. C. **Evolução tecnológica das rotas de gaseificação e pirólise de materiais lignocelulósicos: um estudo bibliométrico**. 2012. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://objdig.ufrrj.br/61/dissert/793949.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2021.

DAFUL, A. G., GORGENS, J. F. Techno-economic analysis and environmental impact assessment of lignocellulosic lactic acid production. *Chemical Engineering Science*, v. 162, p. 53–65, 2017.

DUSSAN, K. J. **Produção de bioetanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos em campo eletromagnético.** 2013. 171 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, USP, Lorena, 2013. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-07102013-091810/publico/BIT13003_C.pdf. Acesso em: 01 abr. 2021.

FRANÇOSO, L. O. **Xilitol: um edulcorante diversificado e benéfico para a saúde humana – Uma revisão bibliográfica.** 2015. 54 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Ciências, UNESP, Bauru, 2015. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/124342>. Acesso em 22 nov. 2020.

GARCIA, A. D. **Produção fermentativa de 2,3-butanodiol a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto.** 2006. 112 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, USP, Lorena, 2006. Disponível em: <http://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/antigas/2006/BIT06003.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2020.

GEANKOPLIS, C. J. **Transport processes and separation process principles: (includes unit operations).** 4 ed. Nova Jersey: Prentice Hall Professional Technical Reference, 2003, p. 1026.

KOMESU, A. **Estratégias de separação e purificação do ácido láctico produzido por via fermentativa.** 2015. 285 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2015. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266027>. Acesso em: 22 nov. 2020.

LAW *et al.* Recovery of succinic acid from fermentation broth by forward osmosisassisted crystallization process. **Journal of Membrane Science**, v. 583, p. 139-151, 2019.

LENGOWSKI, E. C, MUNIZ, G. I. B., NISGOSKI, S., MAGALHÃES, W. L. E. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 41, n. 98, p. 185-194, jun. 2013.

LIMA, G. M. **Desenvolvimento de um aplicativo híbrido para projetar equipamentos de separação sólido-fluido no campo gravitacional e no campo centrífugo**. 2019. 172 p. Dissertação (Mestrado em Inovação Tecnológica) – UFTM, Uberaba, 2019.

LORENCINI, P. **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio**. 2013. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2013. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-11062013-133935/en.php>. Acesso em: 12 nov. 2020.

MACHADO JR, F. R. S. **Ruptura celular, extração e encapsulamento de astaxantina de Haematococcus pluvialis (Volvocales, Chlorophyta)**. 2014. 104 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, UFRG, Rio Grande, 2014. Disponível em: <http://www.repositorio.furg.br/handle/1/6545>. Acesso em: 12 nov. 2020.

MARQUETTO, S. R. **Bioprodução de compostos intermediários: Comparativo de processos e análises e de alternativas biotecnológicas**. 2018. 38 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Escola de Engenharia, UFRGS, Porto Alegre, 2018. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/217531>. Acesso em: 28 mar. 2021.

MARTINS, F. A. *et al.* A produção do etanol de segunda geração a partir do bagaço da cana-de-açúcar. **Revista Latino Americana de Inovação e Engenharia de Produção**, Curitiba, v.2, n.3, p. 5-16, jul./dez. 2014.

MEDEIROS, F. O. **Adsorção e purificação da enzima beta-galactosidade de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através de cromatografia de troca iônica**. 2008. 89 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Departamento de Química, UFRG, Rio Grande, 2008. Disponível em: <http://www.repositorio.furg.br/handle/1/3055>. Acesso em: 16 out. 2020.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, Goiânia, v.3, n.5, p. 9-23, jan./jun., 2009.

MUSSATTO, S. I.; SANTOS, J. C.; FILHO, W. C. R.; SILVA, S. S. A study on the recovery of xylitol by batch adsorption and crystallization from fermented sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Lorena, v. 81, p. 1840-1845, 2006.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549-58, 2010.

OONKHANOND, B *et al.* Lactic acid production from sugarcane bagasse by an integrated system of lignocellulose fractionation, saccharification, fermentation, and ex-situ nanofiltration. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Nakhon Pathom, v.5, p. 2533–2541, 2017.

OPPE, E. E. G. **Desidratação por destilação azeotrópica da glicerina obtida como subproduto da produção do biodiesel**. 2008. 127 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2008. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/tde-30052008-141527/en.php>. Acesso em: 23 nov. 2020.

PEREIRA JR., N.; BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. **Tecnologia de Bioprocessos**, 1. ed. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 414 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2010. Disponível

em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266933>. Acesso em: 28 mar. 2021.

RIVAS, B.; TORRE, P.; DOMÍNGUEZ, J. M.; CONVERTI, A.; PARAJOÁ, J. C. Purification of xylitol obtained by fermentation of corncob hydrolysates. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4430-4435, 2006.

RODRIGUES, G. A. **Produção de ácido láctico a partir do bagaço da cana de açúcar**. 2012. 178 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2012. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266700>. Acesso em: 15 jan. 2021.

ROCHA, L. B. **Análise e otimização exergoeconômica de um sistema de destilação industrial para produção de bioetanol**. 2015. 156 p. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, UEM, Maringá, 2015. Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/bitstream/1/3748/1/000223897.pdf>. Acesso em: 23 de fev. 2021.

SALOMÃO, G. S. B. **Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato**. 2017. 82 p. Dissertação (Mestrado em Energia) – Centro Universitário Norte do Espírito Santo, UFES, Espírito Santo, 2017. Disponível em: http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_10784_Defesa_Gabriella%20Salom%E3o.pdf. Acesso em: 22 de nov. 2020.

SANTOS, D.T. *et al.* Tecnologia supercrítica como uma alternativa para purificar xilitol biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. v. 32, n. 2, p. 621-632, abr./jun. 2011.

SANTOS, F. A. *et al.* Potencial da palha da cana-de-açúcar para a produção de etanol. **Química Nova**. Viçosa, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SCHMIDELL NETTO, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**, v.2, São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

SILVA, F. L. **Extração e purificação de 2,3-butanodiol utilizando sistemas aquosos bifásicos e processos de separação por membranas**. 2021. 94 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/216146>. Acesso em: 19 jan. 2021.

SILVA, D. D. V., DUSSÁN, K. J., IDARRAGA, A., GRANGEIRO, L., SILVA, S. S., CARDONA, C. A., QUINTERO, J., FELIPE, M. G. A. Production and purification of xylitol by *Scheffersomyces amazonenses* via sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 14, p. 344-356, 2020.

SOUSA, A. S. **Cromatografia de permeação em gel em escala semi-preparativa aplicada à caracterização, purificação e fracionamento do ácido hialurônico produzido por cultivos de microorganismos**. 2007. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFCE, Fortaleza, 2007. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/15772>. Acesso em: 13 dez. 2020.

STREIT, K. F. **Estudo da Aplicação de processos de separação com membranas no tratamento de efluentes de curtume: nanofiltração e eletrodialise**. 2011. 182 p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola de Engenharia, UFRGS, 2011. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/32595>. Acesso em: 07 nov. 2020.

TAMANINI, C. et al. Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xilitol. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 117-125, 2004.

TESCAROLLO, I. L. **Expansão do conhecimento e inovação tecnológica no campo das ciências farmacêuticas**. 1 ed. Ponta Grossa: Atena, 2020. 195 p.

TONG, W. Y. et al. Purification of l(+)-lactic acid from fermentation broth with paper sludge as a cellulosic feedstock using weak anion exchanger Amberlite IRA-92. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 89–96, 2004.

TRINDADE, R. S. **Caracterização de membranas poliméricas aplicadas ao processo de microfiltração**. 2010. 74 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Escola de Engenharia, UFRGS, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/25808>. Acesso em: 19 out. 2020.

VIEGAS, J. C. T. **Utilização da Tecnologia de Membranas na Purificação de Xaropes de Glucose**. 2014. 76 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2014. Disponível em: <https://run.unl.pt/handle/10362/39710>. Acesso em: 22 nov. 2020.

VILELA, E. D. S. **Análise da produção de celulasas e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces sp.*** 2013. 70 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, UFG, Goiânia, 2013. Disponível em: <https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/101/o/Elvia.pdf>. Acesso em: 14 out. 2020.

XAVIER, M. C. A. **Bioconversão de xilose em ácido láctico**. 2011. 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2011. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266847>. Acesso em: 15 nov. 2020.

XU *et al.* Separation of lactic acid from synthetic solutions and the mixture directly derived from corn stover by aqueous two phase extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 204, p. 281–289, 2018.