



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Mariane Daniella da Silva

Produção de etanol de segunda geração por co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho, sisal e resíduos de mandioca utilizados como substratos

São José do Rio Preto

2022

Mariane Daniella da Silva

Produção de etanol de segunda geração por co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho, sisal e resíduos de mandioca utilizados como substratos

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, como requisito para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz.

São José do Rio Preto/SP

2022

Da Silva, Mariane Daniella.

Produção de etanol de segunda geração por co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho, sisal e resíduos de mandioca utilizados como substratos / Mariane Daniella da Silva. -- São José do Rio Preto, 2022
106 f. : il.

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Fermentação. 2. Resíduos. 3. Bioetanol. 4. Alimentos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências
Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Mariane Daniella da Silva

Produção de etanol de segunda geração por co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho, sisal e resíduos de mandioca utilizados como substratos

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, como requisito para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Banca Examinadora

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
UNESP – Campus São José do Rio Preto, SP.
Orientador.

Prof. Dr. Javier Telis Romero
UNESP – Campus São José do Rio Preto, SP.

Prof. Dr. Tiago Carregari Polachini
UNESP – Campus São José do Rio Preto, SP.

Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha
UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, PR.

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho
UEM – Universidade Estadual de Maringá, PR.

São José do Rio Preto – SP

27 de outubro de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais. Agradeço imensamente a minha mãe. Pela minha educação e por me tornar quem eu sou. Suas orações me deram forças para continuar.

Ao meu querido orientador, Professor Crispin, muito obrigada por ser quem abriu os braços para me acolher na UNESP. Por ser esse amigo que esteve presente não apenas nos bons momentos, sempre me apoiou e me colocou para cima. Por ser esse exemplo que me faz seguir, pela sua sabedoria em direcionar e apontar o melhor caminho, por todo conhecimento compartilhado. Por toda a ajuda nestes anos de amizade, pela confiança que sempre deposita em mim e por nunca desistir do meu trabalho. Por ser essa pessoa amável que nunca me deixou sozinha, com sua paciência e dedicação para me ensinar, quem me fez amar mais ainda a ciência e a pesquisa. Agradeço, ainda, pelo incentivo e, principalmente, pelo cuidado e sensibilidade com que me ajudou a conduzir esse trabalho.

Agradeço infinitamente a minha segunda mãe, sem você Herta eu não estaria onde estou. Deus foi muito bondoso ao me permitir conhecer e viver com essa mulher esplêndida que me ensinou a ter muita força e muita fé.

Ao meu irmão de alma e coração, Eduardo, que me deu forças nessa caminhada. Foi a minha melhor companhia. Obrigada por tanto amor, carinho, companheirismo e felicidade.

Agradeço ao apoio, companheirismo e por todo amor do meu namorado.

A vida foi maravilhosa ao me presentear vocês.

Aos meus amigos e família Psicoliders, onde eu encontrei refúgio e segurança nessa jornada. Aos que fizeram meus dias no IBILCE serem os mais felizes.

Agradeço aos professores membros da banca pelo incentivo, avaliações e ajuda. Em especial aos professores do programa. Seus ensinamentos foram muitos e certamente contribuíram para a minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Gratidão!

RESUMO

Os materiais lignocelulósicos são gerados em grande quantidade por resíduos industriais, da agricultura, resíduos urbanos, entre outros. Estes podem ser utilizados como fonte de biomassa para a produção de etanol de segunda geração. Os biocombustíveis apresentam uma combustão que agride menos a atmosfera quando comparado com a queima dos combustíveis fósseis. Isso torna indispensável à pesquisa por etanol celulósico. Portanto, o objetivo desse trabalho foi produzir etanol de segunda geração a partir de hidrolisados ácidos de sabugo de milho, sisal e resíduos de mandioca. Para isso, esses materiais foram hidrolisados com ácido sulfúrico diluído em diferentes concentrações (0,0 até 5,5%) e dois tempos de aquecimento em autoclave (15 e 30 min.). Estes hidrolisados foram desintoxicados para remover compostos inibitórios da fermentação. As fermentações realizadas utilizaram as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 em um meio sintético composto por diferentes concentrações de glicose ou xilose (2,0; 4,0 e 6,0%) para a avaliação dos melhores parâmetros a serem utilizados durante a fermentação dos hidrolisados dos resíduos lignocelulósicos. Além das concentrações foram avaliados o pH inicial (5,5; 6,0 e 6,5) e a agitação do meio (0, 50 e 100 rpm). Os hidrolisados que apresentaram os melhores rendimentos em açúcares fermentescíveis foram selecionados para substituição da glicose e/ou xilose nas fermentações. Os parâmetros selecionados para a hidrólise ácida dos substratos foram 2,5% de ácido sulfúrico e 15 min. de aquecimento em autoclave (121 °C/ 1.1 atm.). O sabugo de milho resultou em 39,99 g.L⁻¹ de açúcares totais, 35,57 g.L⁻¹ de açúcares redutores e 1,77 g ác. vanílico/g de compostos fenólicos. Para o sisal foram 12,90 e 9,04 g.L⁻¹ de açúcares totais e redutores e 1,65 g ác. vanílico/g de compostos fenólicos; e para os resíduos de mandioca a melhor concentração do ácido foi de 2,0%, também durante 15 min., resultando em 66,91 e 48,43 g.L⁻¹ de açúcares totais e redutores e 0,27 g ác. vanílico/g de compostos fenólicos. Após a desintoxicação, os teores de compostos fenólicos diminuíram de 50 a 70%. Os melhores resultados das fermentações realizadas com a *S. cerevisiae*, no meio sintético de glicose, mostram que o crescimento celular e produção de etanol foi no meio sem agitação (0 rpm) e pH inicial de 6,5 proporcionando 28,37 g.L⁻¹ de etanol. A fermentação com *P. tannophilus* foi realizada com agitação de 50 rpm e no mesmo pH e concentração iniciais para *S. cerevisiae*. A fermentação pelo consórcio foi realizada utilizando esses parâmetros selecionados. A inoculação das duas leveduras no início da fermentação atingiu o melhor teor de etanol (23,93 g.L⁻¹) em 24 h de incubação. A substituição da fonte de carbono pelos hidrolisados promoveu

desenvolvimento celular e produção de etanol. Os hidrolisados de sabugo de milho produziram 12,40 g.L⁻¹ de etanol, no hidrolisado de sisal foi alcançado 10,50 g.L⁻¹ e nos resíduos de mandioca 15,20 g.L⁻¹ de etanol. Portanto, esses resíduos lignocelulósicos são uma alternativa para a produção de etanol 2G.

Palavras-chave: Fermentação. Resíduos. Lignocelulósicos. Combustível. Celulose. Lignina.

ABSTRACT

Lignocellulosic materials are generated in large quantities by industrial, agricultural and urban waste, among others. These can be used as a source of biomass for the production of second-generation ethanol. Biofuels have a combustion that is less harmful to the atmosphere when compared to the burning of fossil fuels. This makes the search for cellulosic ethanol indispensable. Therefore, the objective of this work was to produce second-generation ethanol from acid hydrolysates of corn cob, sisal and cassava residues. For this, these materials were hydrolyzed with diluted sulfuric acid at different concentrations (0.0 to 5.5%) and two heating times in an autoclave (15 and 30 min.). These hydrolysates were detoxified to remove inhibitory compounds from fermentation. The fermentations carried out used the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 and *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 in a synthetic medium composed of different concentrations of glucose or xylose (2.0; 4.0 and 6.0%) to evaluate the best parameters to be used. during the fermentation of lignocellulosic residue hydrolysates. In addition to the concentrations, the initial pH (5.5, 6.0 and 6.5) and the medium agitation (0, 50 and 100 rpm) were evaluated. The hydrolysates that presented the best yields in fermentable sugars were selected to replace glucose and/or xylose in the fermentations. The parameters selected for the acid hydrolysis of the substrates were 2.5% sulfuric acid and 15 min. heating in autoclave (121 °C/ 1.1 atm.). Corn on the cob resulted in 39.99 g.L⁻¹ of total sugars, 35.57 g.L⁻¹ of reducing sugars and 1.77 g. vanillic/g of phenolic compounds. For sisal, there were 12.90 and 9.04 g.L⁻¹ of total and reducing sugars and 1.65 g ac. vanillic/g of phenolic compounds; and for cassava residues, the best acid concentration was 2.0%, also during 15 min., resulting in 66.91 and 48.43 g.L⁻¹ of total and reducing sugars and 0.27 g. vanillic/g of phenolic compounds. After detoxification, the levels of phenolic compounds decreased from 50 to 70%. The best results of the fermentations carried out with *S. cerevisiae*, in the synthetic glucose medium, show that cell growth and ethanol production occurred in the medium without agitation (0 rpm) and initial pH of 6.5, providing 28.37 g.L⁻¹ of ethanol. Fermentation with *P. tannophilus* was carried out with stirring at 50 rpm and at the same initial pH and concentration for *S. cerevisiae*. The consortium fermentation was performed using these selected parameters. The inoculation of the two yeasts at the beginning of the fermentation reached the best ethanol content (23.93 g.L⁻¹) in 24 h of incubation. The replacement of the carbon source by the hydrolysates promoted cell development and ethanol production. The corn cob hydrolysates produced 12.40 g.L⁻¹ of ethanol, in the sisal hydrolyzate it was reached 10.50 g.L⁻¹ and in the

cassava residues 15.20 g.L⁻¹ of ethanol. Therefore, these lignocellulosic residues are an alternative for the production of 2G ethanol.

Keywords: Fermentation. Waste. Lignocellulosic. Fuel. Cellulose. Lignin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do processo de produção do etanol de segunda geração.	23
Figura 2 – Representação da estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica mostrando cada um de seus blocos constituintes.	25
Figura 3 – Estrutura de um polímero de celulose apresentando a unidade básica de celobiose e as ligações β -(1-4) entre as glicoses.	26
Figura 4 – Estrutura de um polímero de hemicelulose representada por alguns de seus açúcares constituintes.	27
Figura 5 – Estrutura de uma macromolécula de lignina.	28
Figura 6 – Corte transversal de um sabugo de milho mostrando sua estrutura e partes constituintes.	30
Figura 7 – Plantação de sisal (<i>Agave sisalana</i>).	31
Figura 8 – Representação das vias de formação de subprodutos da degradação da biomassa lignocelulósica durante o tratamento ácido.	35
Figura 9 – Esquema da via de conversão da xilose em etanol.	40
Figura 10 – Efeitos dos parâmetros encontrados no meio de fermentação sobre a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
Figura 11 – Teores de compostos Teores de compostos fenólicos obtidos na hidrólise ácida do sabugo de milho e aquecimento de 15 e 30 min. em autoclave (121 °C/1.1 atm.).	54
Figura 12 – Teores de açúcares totais obtidos na hidrólise ácida do sabugo de milho utilizando concentrações de 0,0 até 5,0% de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) e tratamento térmico durante 15 e 30 min.	55
Figura 13 – Teores de açúcares redutores (AR) obtidos na hidrólise ácida do sabugo de milho e aquecimento de 15 e 30 min. em autoclave (121 °C/1.1 atm.).	56
Figura 14 – Teores de açúcares totais (AT) obtidos na hidrólise ácida de sisal utilizando diferentes concentrações de H ₂ SO ₄ e tempos de aquecimento em autoclave (121 °C).	62
Figure 15 – Teores de açúcares redutores (AR) obtidos na hidrólise ácida do sisal utilizando diferentes concentrações de H ₂ SO ₄ e tempos de aquecimento em autoclave (121 °C).	62
Figura 16 – Teores de compostos fenólicos obtidos nos HB e HD de sisal nas concentrações de ácido sulfúrico utilizadas para o tempo de 15 e 30 min. de aquecimento em autoclave.	63
Figura 17 – Concentrações de açúcares totais (AT) e açúcares redutores (AR) liberados durante a hidrólise ácida dos resíduos de mandioca, nos HB e HD, a partir de diferentes concentrações de H ₂ SO ₄ e tempos de aquecimento de 15 e 10 min. em autoclave.	66
Figura 18 – Teores de compostos fenólicos obtidos nos HB e HD dos resíduos de mandioca nas concentrações de ácido sulfúrico utilizadas para o tempo de 10 e 15 min. de aquecimento em autoclave.	67

Figura 19 – Cromatograma do composto furfural antes e após a desintoxicação do hidrolisado de sabugo de milho (sinal pelo tempo de retenção).....	70
Figura 20 – Crescimento celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ de glicose e sais minerais, incubado a 30 °C durante 24 h.....	72
Figura 21 – Alteração de pH no meio de fermentação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ de glicose e sais minerais, incubado a 30 °C durante 24 h.	74
Figura 22 – Produção de etanol pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ de glicose e sais minerais incubado a 30 °C durante 24 h.....	75
Figura 23 – Consumo de açúcares pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ de glicose e sais minerais incubado a 30 °C durante 24 h.	77
Figura 24 – Crescimento celular da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ de glicose e sais minerais, incubado a 30 °C durante 24 h.....	79
Figura 25 – Alteração de pH no meio de fermentação da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ e sais minerais, incubado a 30 °C durante 24 h.	80
Figura 26 – Produção de etanol pela levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ e sais minerais incubado a 30 °C durante 24 h.	81
Figura 27 – Consumo de açúcares pela levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ e sais minerais incubado a 30 °C durante 24 h.	82
Figura 28 – Crescimento celular da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> em meio contendo xilose com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ e sais minerais, incubado a 30 °C durante 24 h.	83
Figura 29 – Alteração de pH no meio de fermentação da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> em meio contendo xilose com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais dos meios sintéticos formados por 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ e sais minerais, incubado a 30 °C durante 24 h.....	85
Figura 30 – Produção de etanol pela levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> em meio contendo xilose com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ de glicose e sais minerais incubado a 30 °C durante 24 h.	86
Figura 31 – Consumo de açúcares pela levedura <i>Pachysolen tannophius</i> em meio contendo xilose com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ de glicose e sais minerais incubado a 30 °C durante 24 h.	87

Figura 32 – Consumo de açúcares pelo consórcio das leveduras <i>S. cereveisiae</i> e <i>Pachysolen tannophilus</i> incubadas a 30 °C durante 24 h.	89
Figura 33 – Produção de etanol pelo consórcio das leveduras <i>Saccharomyces cereveisiae</i> e <i>Pachysolen tannophilus</i> incubadas a 30 °C durante 24 h.	90
Figura 34 – Curva padrão de glicose para açúcares totais.	102
Figura 35 – Curva padrão de glicose para açúcares redutores.	103
Figura 36 – Curva padrão de ácido vanílico para calculo do teor de compostos fenólicos....	104
Figura 37 – Curva padrão de glicose para crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	105
Figura 38 – Curva padrão de crescimento da <i>Pachysolen tannophilus</i>	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de materiais lignocelulósicos que são considerados resíduos agroindustriais.	29
Tabela 2 – Métodos que podem ser utilizados na desintoxicação de hidrolisados lignocelulósicos.	38
Tabela 3 – Delineamento experimental, contendo as variáveis independentes, estudadas para a produção de etanol pelas leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. tannophilus</i> , variando a concentração de açúcares, a agitação e o pH.....	47
Tabela 4 – Média e desvios padrão de todas as análises realizadas (açúcares totais, redutores e compostos fenólicos em g.L ⁻¹) para os hidrolisados de sabugo de milho durante a hidrólise ácida e 15 min. de tratamento térmico (121 °C/1.1 atm.).	52
Tabela 5 – Média e desvios padrão de todas as análises realizadas (açúcares totais, redutores e compostos fenólicos) para os hidrolisados de sabugo de milho durante a hidrólise ácida e 30 min. de tratamento térmico (121 °C/1.1 atm.).	53
Tabela 6 – Resultados estatísticos das diferentes hidrólises realizadas nos HB e HD de sisal, nas concentrações de ácido sulfúrico utilizadas para o tempo de 15 min. de aquecimento em autoclave (121 °C).	60
Tabela 7 – Resultados estatísticos das diferentes análises realizadas nos HB e HD do sisal, nas concentrações de ácido sulfúrico utilizadas para o tempo de 30 min. de aquecimento em autoclave (121 °C).	61
Tabela 8 – Resultados estatísticos das diferentes análises realizadas nos HB e HD dos resíduos de mandioca nas concentrações de ácido sulfúrico utilizadas para o tempo de 10 min. de aquecimento em autoclave (121 °C).	65
Tabela 9 – Análise estatística das diferentes análises realizadas nos HB e HD dos resíduos de mandioca nas concentrações de ácido sulfúrico testadas para o tempo de 15 min. de aquecimento em autoclave (121 °C).	65
Tabela 10 – Compostos utilizados como padrão na análise dos meios hidrolisados e seus respectivos tempos de retenção obtidos por HPLC.	69
Tabela 11 – Compostos obtidos na análise por HPLC dos meios hidrolisados bruto e desintoxicado.	69
Tabela 12 – Alteração de pH nas concentrações de 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ com desvio padrão de ± 0,01.	73
Tabela 13 – Compostos fenólicos em 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ obtidos dos meios fermentados pela levedura <i>S. cerevisiae</i>	78
Tabela 14 – Alteração de pH nas concentrações de 20, 40 e 60 g.L ⁻¹ com desvio padrão de ± 0,01.	79
Tabela 15 – Alteração de pH nas concentrações 20, 40 e 60 g.L ⁻¹	84

Tabela 16 – Resultados dos ensaios do consórcio das leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. tannophilus</i> , meios e concentrações da fonte de carbono, velocidade de agitação, pH e tempo em que ocorreu a inoculação de troca da levedura, produção de biomassa, etanol e produtividade.	88
Tabela 17 – Médias para produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, tempo de maior produção, em pH inicial de 6,5 e concentração inicial de 40 g.L ⁻¹ de açúcares.	91
Tabela 18 – Concentrações de glicose (g/L) e absorbâncias obtidas na construção da curva padrão para quantificação de açúcares totais.	102
Tabela 19 – Concentrações de glicose (g/L) e absorbâncias determinadas na obtenção da curva padrão de glicose para açúcares redutores.	103
Tabela 20 – Concentrações de ácido vanílico (g/L) e absorbâncias determinadas na obtenção da curva padrão de ácido vanílico para determinação de compostos fenólicos.	104
Tabela 21 – Peso celular da levedura (g/L) e absorbâncias determinadas na obtenção da curva do crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	105
Tabela 22 – Peso celular da levedura (g/L) e absorbâncias determinadas na obtenção da curva do crescimento de <i>Pachysolen tannophilus</i>	106

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 ETANOL	21
3.2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G)	22
3.3 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	24
3.3.1 Celulose.....	25
3.3.2 Hemicelulose	26
3.3.1 Lignina.....	27
3.4 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS: SABUGO DE MILHO, SISAL E RESÍDUOS DE MANDIOCA	28
3.5 HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	32
3.6 HIDRÓLISE ÁCIDA.....	33
3.7 COMPOSTOS INIBIDORES.....	34
3.7.1 Ácidos carboxílicos	35
3.7.2 Derivados de furanos.....	36
3.7.3 Compostos fenólicos	36
3.8 DESINTOXICAÇÃO	37
3.9 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 MATÉRIA-PRIMA	43
4.2 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA	43
4.3 HIDRÓLISE ÁCIDA DA BIOMASSA	43
4.4 DESINTOXICAÇÃO DO HIDROLISADO	43
4.5 MICRO-ORGANISMOS.....	44
4.6 MEIOS DE CULTURA.....	44
4.6.1 Meio de manutenção.....	44
4.6.2 Propagação/Ativação das culturas e preparo do inóculo.....	44
4.6.3 Padronização do inóculo	44

4.6.4	Curva padrão de calibração para a determinação da concentração celular a partir de suspensões das leveduras	45
4.7	MEIOS DE FERMENTAÇÃO.....	45
4.7.1	Meio Sintético.....	45
4.7.2	Meio contendo os hidrolisados de sabugo de milho, sisal e resíduos de mandioca usados como fonte de carbono	46
4.8	CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	46
4.8.1	Avaliação das variáveis que influenciam a produção de etanol: tempo de incubação, velocidade de agitação e efeito do pH.....	46
4.8.2	Avaliação das fermentações utilizando os hidrolisados	47
4.9	CO-CULTURA.....	47
4.10	MÉTODOS ANALÍTICOS	48
4.10.1	Determinação do pH.....	48
4.10.2	Determinação da concentração celular.....	48
4.10.3	Determinação de etanol.....	48
4.10.4	Determinação de açúcares totais (AT).....	48
4.10.5	Determinação de açúcares redutores (AR)	48
4.10.6	Determinação do teor de compostos fenólicos	49
4.11	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS POR CLAE	49
4.12	ANÁLISE DOS RESULTADOS	50
4.12.1	Cálculo da produtividade.....	50
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	HIDRÓLISE DA BIOMASSA	51
5.1.1	Sabugo de milho.....	51
5.1.2	Folhas de Sisal.....	59
5.1.3	Resíduos de mandioca	64
5.2	ANÁLISES DE COMPOSTOS INIBITÓRIOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE/HPLC).	68
5.3	ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO COM O USO DE MEIO SINTÉTICO	71
5.3.1	Avaliação dos parâmetros: tempo de incubação, agitação e pH inicial do meio	71
6.	CONCLUSÕES	93
7.	REFERÊNCIAS	94
8.	ANEXOS	102
8.1	CURVA PADRÃO DE GLICOSE PARA AÇÚCARES TOTAIS.....	102

8.2	CURVA PADRÃO DE GLICOSE PARA AÇÚCARES REDUTORES	103
8.3	CURVA PADRÃO DE ÁCIDO VANÍLICO PARA COMPOSTOS FENÓLICOS 104	
8.4	CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR PARA A LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	105
8.5	CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR PARA A LEVEDURA <i>PACHYSOLEN TANNOPHILUS</i>	106

1. INTRODUÇÃO

O atual crescimento populacional está relacionado diretamente com o aumento do consumo dos combustíveis fósseis, com maior demanda de alimentos e água potável, impactando o meio ambiente de todo o planeta. Com isso, temos a necessidade de redução das emissões de gases do efeito estufa e consequentemente do aquecimento global.

Para que isso seja consolidado é imprescindível reduzir o uso das fontes de energia não renováveis, que são altamente poluentes, e pesquisar fontes alternativas renováveis. O que torna a produção de bioetanol interessante e vantajosa para o mundo todo, uma vez que, o etanol apresenta uma matriz energética mais limpa, quando comparado com os combustíveis de origens fósseis, como a gasolina e o diesel, além do seu alto valor de octanagem e combustão eficiente. Portanto, o uso desse álcool é uma alternativa menos poluente ao meio ambiente.

O etanol combustível, denominado etanol de primeira geração, é produzido a partir da fermentação de açúcares provenientes de matérias-primas vegetais, como a cana-de-açúcar, o milho, o trigo e a beterraba açucareira, o que gera muitos resíduos. Por outro lado, na agricultura e na indústria alimentícia também há grande produção de resíduos que são dispostos inadequadamente, descartados ou queimados, sendo um problema ambiental. Em geral, a estrutura da parede celular desses resíduos apresenta lignina, hemicelulose e celulose, que, quando rompidas liberam monossacarídeos, os quais, podem ser utilizados por micro-organismos para a produção de etanol de segunda geração (etanol 2G).

As pesquisas para a reutilização desses resíduos como substratos para produção de etanol 2G buscam solucionar o problema da poluição ambiental gerada por eles, já que é obtido a partir de material lignocelulósico, que não é comestível, não competindo com as áreas cultiváveis utilizadas para a produção de alimentos, uma vez que o produto de interesse já foi extraído. Além de que, também podem ser usadas outras culturas que não são utilizadas na alimentação humana.

No Brasil, os resíduos provenientes do setor sucroalcooleiro são os mais utilizados em pesquisas para obtenção do etanol 2G, por apresentarem vasta disponibilidade. No entanto, outros tipos de resíduos lignocelulósicos são promissores para a produção de etanol 2G, como, por exemplo, os resíduos do milho, como o sabugo, a planta de sisal e os resíduos de mandioca que serão estudados neste trabalho.

O processo para a produção de etanol 2G é baseado em quatro fases: o pré-tratamento do resíduo, sua hidrólise e fermentação e por último a destilação para obtenção do produto final. O pré-tratamento, em geral, consiste na redução do tamanho da partícula do material

lignocelulósico, enquanto a hidrólise é a quebra das ligações químicas entre as moléculas constituintes. Esta pode ser realizada por meio de métodos químicos, físicos ou biológicos.

Na fermentação alcoólica, o micro-organismo mais comumente utilizado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por ser capaz de produzir etanol em altas concentrações. Além disso, a *S. cerevisiae* é resistente a diferentes meios de cultura e condições fermentativas. Contudo, não utiliza todos os açúcares obtidos pela hidrólise da estrutura lignocelulósica, pois, não apresenta eficiência em assimilar a xilose que é liberada durante o processo de hidrólise da biomassa. Ainda assim, essa levedura é considerada um micro-organismo vantajoso para a conversão dos hidrolisados lignocelulósicos em etanol. Isso em decorrência da sua alta tolerância a altas concentrações de etanol no meio de cultura e à capacidade para fermentar em condições estritamente anaeróbicas.

Na literatura são apresentadas duas alternativas para o melhor aproveitamento dos açúcares fermentescíveis (hexoses e pentoses) liberados na hidrólise da biomassa lignocelulósica. A primeira utiliza micro-organismos geneticamente modificados, com o objetivo de fermentar tanto a glicose quanto a xilose. E a segunda utiliza dois micro-organismos simultaneamente em um único sistema reacional, definido como “co-cultura”.

A *Pachysolen tannophilus* é uma levedura que tem capacidade natural de utilizar glicose e, na ausência desta, pode utilizar xilose para a produção de etanol. Deste modo, foi possível formar uma co-cultura (consórcio) entre as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e a *Pachysolen tannophilus* CCT 1891.

Em síntese, o objetivo principal desta pesquisa foi estudar o efeito da hidrólise ácida de sabugo de milho, de folhas de sisal e de resíduos de mandioca utilizados como substrato para a obtenção de etanol. E então, determinar os parâmetros envolvidos nessa produção com cada uma das leveduras e por co-cultura.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito da hidrólise ácida de sabugo de milho, sisal e de resíduos de mandioca, utilizados como substrato para a obtenção de etanol. Assim como, estudar os parâmetros envolvidos na produção de etanol por co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as variáveis envolvidas na hidrólise ácida: concentração de ácido e tempo de hidrólise para cada substrato estudado;
- Analisar a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 em diferentes concentrações de glicose (2,0; 4,0 e 6,0%);
- Analisar a produção de etanol por *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 em diferentes concentrações de glicose (2,0; 4,0 e 6,0%) e xilose (2,0; 4,0 e 6,0%), separadamente;
- Estudar a produção de etanol por co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* em meio contendo uma mistura de glicose e xilose nas melhores concentrações encontradas;
- Pesquisar o efeito da agitação (0, 50 e 100 rpm), tempo (durante 24 h) e da variação do pH inicial do meio (5,5; 6,0 e 6,5) no processo fermentativo dos meios sintéticos.
- Utilizar os melhores parâmetros selecionados nos ensaios dos meios contendo os hidrolisados de sabugo de milho, sisal e resíduos de mandioca, desintoxicados e sem desintoxicação, para a produção de etanol;
- Determinar a produção de etanol utilizando os hidrolisados ácidos de sabugo de milho, sisal e resíduos de mandioca por *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus*, separadamente, e por co-cultura, nas concentrações equivalentes às melhores concentrações encontradas para glicose e xilose;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ETANOL

O Brasil foi o primeiro país a utilizar os biocombustíveis e atualmente é o líder na tecnologia da produção e o maior produtor mundial de etanol de cana-de-açúcar. Além disso, é o segundo maior gerador de bioetanol do mundo, sendo responsável por 30% da produção total mundial com 8,86 milhões de galões gerados em 2019 e 7,43 em 2021. Os Estados Unidos (EUA), entretanto, empregam o milho para a produção desse combustível e lideram o ranking com 55% da produção total mundial, 15 milhões de galões (RFA, 2021).

O etanol surgiu no Brasil em 1975, por meio do programa Proálcool (Programa Nacional do Álcool), que tinha como objetivo diminuir a importação do petróleo, uma vez que, o preço do barril estava alto em todo o mundo, e assim, o etanol seria produzido a partir da cana-de-açúcar para ser empregado em veículos de combustão interna. Além da substituição à gasolina, iria diminuir a dependência da utilização de combustíveis fósseis, que são recursos não renováveis e poluentes ao meio ambiente (CGEE, 2017).

A combustão dos derivados de petróleo representa 97% dos gases poluentes para o meio ambiente, e o uso dos biocombustíveis renováveis reduz o envio de carbono para a atmosfera. Portanto, um dos objetivos da produção do etanol é o arrefecimento das emissões de gases de efeito estufa (GEE) (EPA, 2020).

Em 2021 nos EUA, o uso de etanol na gasolina reduziu a emissão de CO₂, gás que causa o efeito estufa, em 54,5 milhões de toneladas no setor de transporte. Isso é equivalente a remover 12 milhões de carros das estradas por um ano inteiro ou eliminar a emissão anual de 13 usinas de carvão (RFA, 2021).

O etanol comum também é conhecido como etanol de primeira geração é uma opção de produção sustentável de energia, gerada a partir de uma grande variedade de matérias-primas vegetais que contenham quantidades significativas de açúcares ou de estruturas poliméricas, tais como, o amido e a celulose, que podem ser hidrolisadas e convertidas em açúcares fermentescíveis (GOLDEMBERG et al., 2017). No entanto, outras matérias-primas como os resíduos agroindustriais ricos em fibras celulósicas e amido também podem ser utilizados. Esses resíduos são materiais lignocelulósicos identificados como biomassa, fontes biológicas renováveis mais abundantes da natureza.

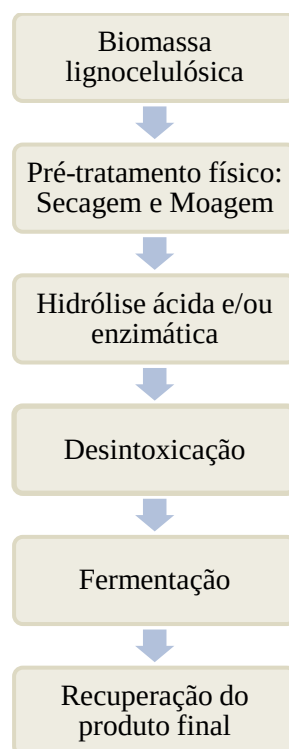
3.2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G)

O etanol de segunda geração é o etanol chamado de celulósico, produzido a partir de açúcares fermentescíveis derivados do rompimento das cadeias de celulose e hemicelulose da biomassa de materiais industriais, resíduos agrícolas e florestais, ou seja, das partes não comestíveis de uma planta. A produção de etanol 2G é uma vantagem em relação às questões ambientais, pois, é obtido a partir do aproveitamento de resíduos que seriam inutilizados, sendo assim, substitutos potenciais para as fontes não renováveis (CGEE, 2017). Portanto, a pesquisa para uso dos resíduos lignocelulósicos apresenta grande interesse para a obtenção de etanol 2G.

Os resíduos lignocelulósicos apresentam em sua constituição polímeros de carboidratos que, depois de hidrolisados resultam em monossacarídeos que podem ser convertidos por micro-organismos em etanol de segunda geração (2G). Desta forma, são utilizados vegetais como matéria-prima sem a necessidade de estender a área de cultivo para cana-de-açúcar ou ocupar as áreas para produção de alimentos (NGUYEN et al., 2017; VALLEJOS et al., 2017).

O processo geral para a geração do etanol celulósico inicia-se a partir da moagem do material para reduzir o tamanho das partículas. A biomassa moída precisa então sofrer um tratamento que cause a quebra da rede lignocelulósica em frações individuais de celulose, hemicelulose e lignina que precisam ser transformadas em açúcares solúveis por um método químico ou enzimático, que por sua vez, serão convertidos a etanol durante a fermentação microbiana. O etanol produzido no caldo de fermentação é recuperado por destilação e purificado para obter o etanol combustível. Portanto, o processo necessário para a obtenção do etanol a partir da biomassa lignocelulósica pode ser dividido em quatro etapas principais que incluem pré-tratamento, hidrólise, fermentação e recuperação do produto (Fluxograma 1).

Figura 1 – Esquema do processo de produção do etanol de segunda geração.



Fonte: Autoria própria.

No Brasil há duas empresas que produzem etanol 2G, implantadas em 2014, a GranBio, em São Miguel dos Campos – Alagoas, que utiliza o processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF), e a Raízen, em Piracicaba – São Paulo, que emprega a fermentação por sacarificação e hidrólise separada (SHF).

A GranBio foi a primeira biorrefinaria do Hemisfério Sul a fabricar o etanol 2G em escala industrial, o processo usa palha de cana-de-açúcar, e é constituído pelas etapas de pré-tratamento por explosão a vapor, hidrólise enzimática e fermentação por uma linhagem geneticamente modificada capaz de consumir pentoses e hexoses. Com capacidade de produção de 30 milhões de litros por ano (GRANBIO, 2020).

Enquanto a produção da planta da GranBio é voltada exclusivamente para a produção de etanol 2G, a Raízen opera uma planta integrada com produção de etanol 1G. O processo é realizado com bagaço de cana-de-açúcar e usa pré-tratamento físico através da explosão a vapor e hidrólises ácida e enzimática. A levedura utilizada para fermentação é capaz de fermentar as frações de pentoses e hexoses simultaneamente. Em relatório anual publicado pela Raízen, referente a 2021, foi divulgada a produção de 41 milhões de litros de Etanol 2G por ano. (RAÍZEN, 2021).

Na safra 2019/2020, passou a integrar a formulação dos itens de perfumaria de duas linhas de produtos de O Boticário e Quem disse, Berenice? Os produtos trazem na embalagem um selo que sinaliza a presença de Eco álcool. Atualmente há um grande mercado para o combustível na Califórnia (Estados Unidos), para onde a indústria brasileira exporta quase toda a produção, além, de possuir crescente demanda no mercado europeu (RAÍZEN, 2020).

O etanol 2G ainda não apresenta um preço competitivo à tecnologia de fabricação de etanol de primeira geração (1G), para isso, são necessárias melhorias no processo para diminuir os custos operacionais que ainda são elevados, para assim, obter um combustível mais barato.

3.3 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Por razões econômicas e ambientais, abundância e baixo custo os resíduos agrícolas e outras fontes de carboidratos de baixo valor são um biorrecurso atraente para a produção de biocombustíveis (WANG et al., 2021).

A biomassa lignocelulósica é formada durante a fotossíntese e possui mais átomos de oxigênio na sua composição do que os combustíveis fósseis. A presença desse átomo faz com que a biomassa não necessite de tanto oxigênio do ar, tornando o etanol menos poluente na sua combustão, pois, a quantidade de CO₂ emitida é muito menor devido à presença de um menor teor de carbono. Além de que, o CO₂ emitido pelo etanol é reabsorvido pelas plantações de cana-de-açúcar (CGEE, 2017). É a única matéria-prima renovável que tem potencial para ser convertida em diversos combustíveis líquidos e gasosos, produtos químicos e outros múltiplos produtos de valor agregado (CHAPARRO-GARNICA et al., 2021).

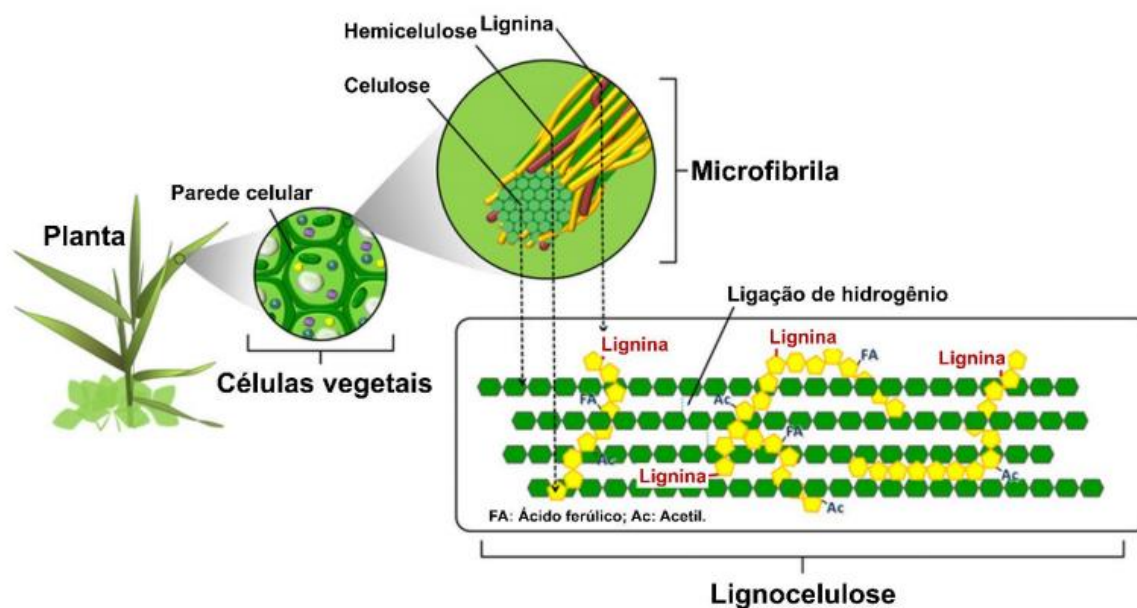
A biomassa é composta por aproximadamente 45% de celulose, 25% de hemicelulose, 20% lignina e o restante são macro e micro nutrientes e extrativos, como óleos, gorduras, proteínas, entre outros. A composição da biomassa depende amplamente do tipo (culturas energéticas ou resíduos agrícolas, madeira dura, madeira macia, etc.), idade, clima e distribuições geográficas (BHATIA et al., 2020).

Essas frações lignocelulósicas compõe uma estrutura rígida e complexa, formada em maior parte por celulose que está envolta por hemicelulose e lignina, o que dificulta a degradação desses materiais. Um fracionamento dessa rede estrutural é necessário para hidrolisar a celulose e a hemicelulose principalmente em glicose e a xilose, sendo indispensável uma etapa de pré-tratamento a fim de converter esses açúcares fermentescíveis em etanol e

outros bioprodutos. A celulose e a hemicelulose referem-se aos carboidratos totais da lignocelulose e representam 60-80% da parede celular (ZHOU; LIU; ZHAO, 2021).

A estrutura da parede celular de uma biomassa lignocelulósica está apresentada na Figura 2.

Figura 2 – Representação da estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica mostrando cada um de seus blocos constituintes.

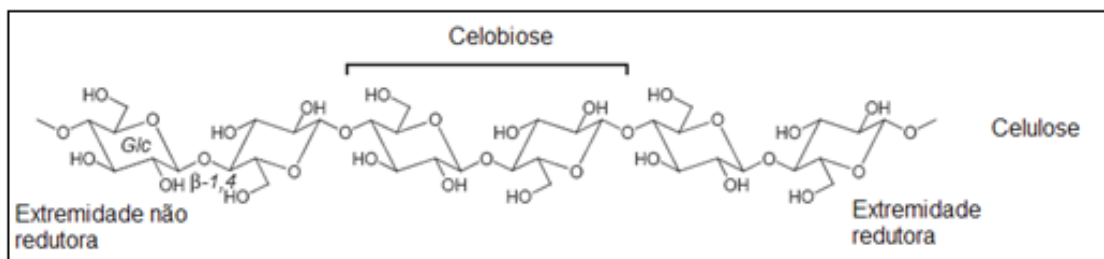


Fonte: RIBEIRO et al., 2016.

3.3.1 Celulose

A celulose é um polímero linear de glicose (açúcar C6 ou hexose) que constitui a parede celular das plantas, sendo a molécula mais abundante da natureza. Está localizada na parte central da estrutura coberta pela hemicelulose que, por sua vez, está rodeada pela lignina. A celulose é um homopolissacarídeo linear constituído de 8.000 a 14.000 unidades de glicose (na conformação de D-glucopirranose) unidas por ligações glicosídicas β -(1-4) (SIVAGURUNATHAN et al., 2021). A Figura 2 mostra a representação das principais ligações entre os constituintes da celulose.

Figura 3 – Estrutura de um polímero de celulose apresentando a unidade básica de celobiose e as ligações β -(1-4) entre as glicoses.



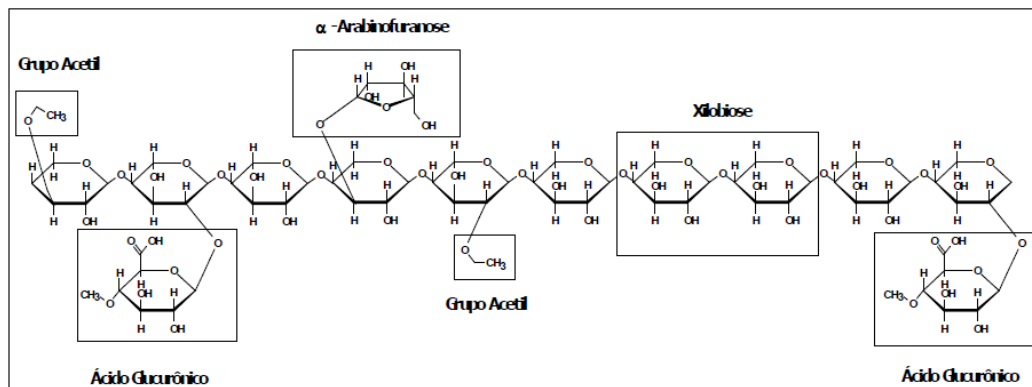
Fonte: SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005.

As cadeias de celulose estão unidas entre si por ligações de hidrogênio intramoleculares, apresentam alta rigidez e regiões cristalinas altamente organizadas, por isso, a celulose é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, mas também apresentam regiões amorfas, onde as cadeias estão agrupadas de maneiras mais irregulares sendo mais suscetíveis à hidrólise (TIBOLLA et al., 2017). A celulose apresenta resistência à hidrólise devido a essas regiões cristalinas e pelas barreiras físicas criadas pela hemicelulose e pela lignina presentes nessa biomassa lignocelulósica. Essa resistência é uma das maiores dificuldades para a conversão biotecnológica da celulose em sacarídeos. Porém, sua estrutura pode ser quimicamente quebrada em glicose ao ser tratada com ácidos em alta temperatura. Quando a celulose é hidrolisada em condições brandas resulta na sua unidade básica, a celobiose (PELISSARI et al., 2014; YAHYA et al., 2018).

3.3.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante na natureza, após a celulose. A macromolécula da hemicelulose é composta principalmente por uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, em um esqueleto de unidades de D-xilopiranosose (D-xilose) unidas por ligações β -1,4 com elevado grau de ramificações, não apresentando, portanto, regiões cristalinas. É constituída em sua maior parte por cadeias de unidades de pentoses (xilose, ramnose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), entretanto, sua constituição varia de planta para planta. A xilana é o polissacarídeo mais abundante da estrutura hemicelulósica (LI et al., 2019).

Figura 4 – Estrutura de um polímero de hemicelulose representada por alguns de seus açúcares constituintes.



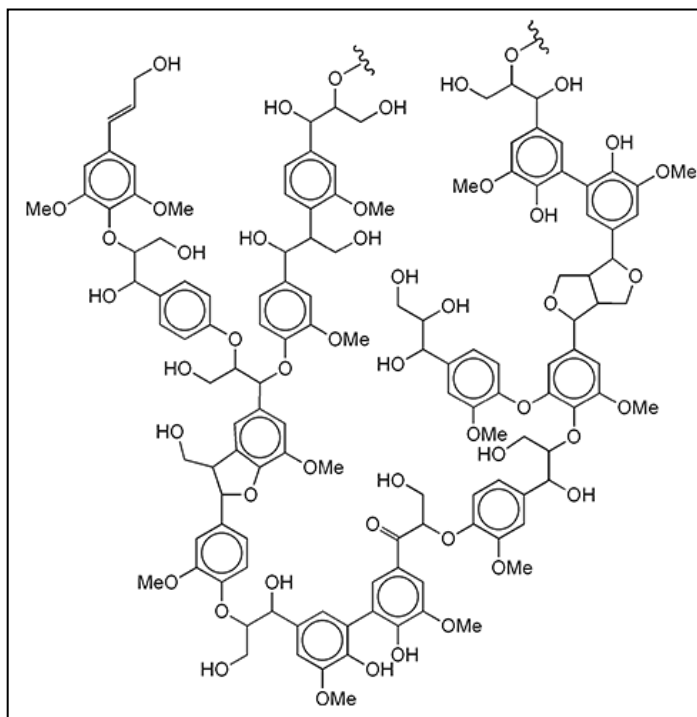
Fonte: MUSSATTO et al., 2010.

3.3.1 Lignina

A lignina desempenha papéis biológicos e estruturais críticos nas plantas. É considerada o esqueleto que confere rigidez à estrutura das paredes celulares das plantas e é encontrada em grande abundância na natureza. Apresenta hidrofobicidade que impede a permeação de água através das paredes celulares, o que garante o transporte eficiente de nutrientes e produtos da fotossíntese. É identificada como um polímero de rede aromática, amorfa, composta por de três unidades de fenilpropano (coniferil, sinapil e *p*-cumaril) ligados por ligações carbono-carbono e éter (WANG et al., 2018).

Nas plantas a lignina está ligada covalentemente com a xilana presente na hemicelulose por meio de ligações tipo éster formando assim uma estrutura complexa que envolve a hemicelulose e as microfibrilas da celulose, durante o progresso da lignificação da planta, aumentando assim a espessura da parede celular, a força de retenção mecânica celular e a resistência à compressão. Sua estrutura tridimensional complexa é o componente mais inerte das plantas, sendo de difícil digestibilidade por micro-organismos, conferindo resistência às pragas (SIVAGURUNATHAN et al., 2021). A estrutura da lignina esta apresentada na Figura 5.

Figura 5 – Estrutura de uma macromolécula de lignina.



Fonte: ACS, 2020.

3.4 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS: SABUGO DE MILHO, SISAL E RESÍDUOS DE MANDIOCA

Os resíduos provenientes da cana-de-açúcar são os mais empregados nas pesquisas sobre a obtenção de etanol 2G.

Um exemplo de matéria-prima adequada para a produção de etanol 2G é o milho, pois, podem ser utilizados as folhas, cascas, talos e o sabugo ao invés dos grãos. Assim, há muito mais matéria-prima para fazer etanol celulósico do que fazer o etanol comum, à base de grãos, tubérculos ou da cana-de-açúcar. Esses resíduos fornecem uma matéria-prima alternativa para a produção de biocombustíveis.

No entanto, outros materiais são promissores para sua produção, como por exemplo, o sabugo de milho, sisal e resíduos provenientes da indústria da mandioca, que serão estudados neste trabalho. A Tabela 1 apresenta a composição de alguns materiais lignocelulósicos que podem ser empregados na produção de biocombustíveis.

Tabela 1 – Composição de materiais lignocelulósicos que são considerados resíduos agroindustriais.

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-38	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Sabugo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Mandioca	25	7	3
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	5-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

Fonte: Adaptado de KUMAR; SHARMA, 2017.

O milho (*Zea mays* L.) é originário da América Central e pertencente à família das gramíneas. Consiste numa cultura de plantio simples e colheita anual e, devido a seu valor nutritivo, rico em vitaminas, proteínas e carboidratos é utilizado principalmente para alimentação humana e animal. Pode ser cultivado em qualquer solo, clima ou altitude (ABMILHO, 2020).

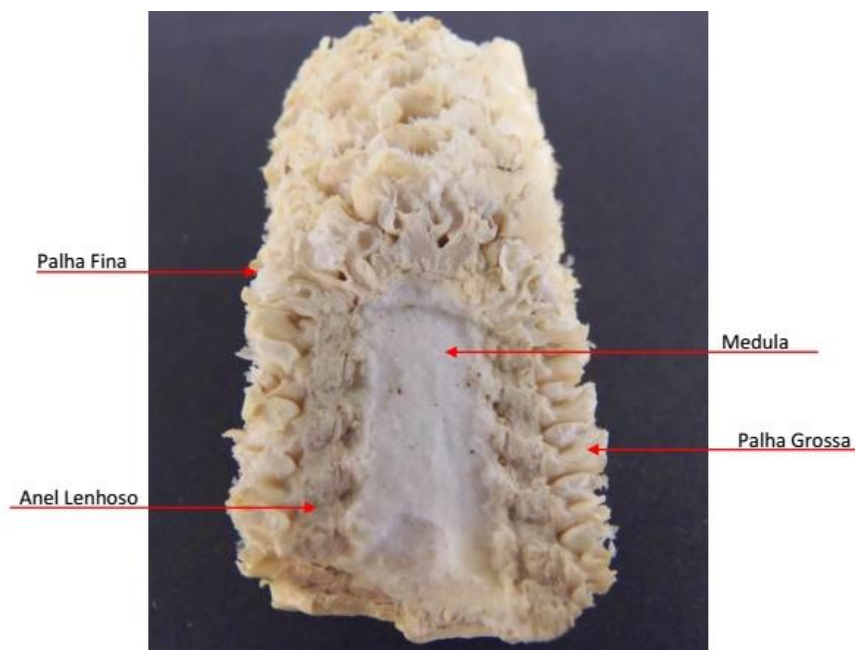
O milho está entre as três espécies vegetais mais cultivadas no planeta, depois do arroz e do trigo. É empregado principalmente na indústria alimentícia. Por outro lado, partes da planta

tratada como rejeitos, não apresentam utilidade nessa área, sendo subutilizadas. Desta maneira, o sabugo, o colmo (caule), as folhas e a palha, formam uma biomassa abundante e de grande produção.

De acordo com a FIESP (2022) a safra mundial de milho 2020/2021 foi de 1.117,11 milhões de toneladas. O Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo, tendo apenas à sua frente os Estados Unidos e a China. A safra de 2020/21 foi de 86 milhões de toneladas (FIESP, 2022).

A espiga de milho é um dos subprodutos mais abundantes da indústria agrícola, após a espiga ser debulhada para a retirada dos grãos de milho o rejeito que se obtém é o sabugo, localizado na parte central das espigas, onde os grãos ficam presos. Em sua composição apresenta alto teor de celulose e hemicelulose (32,3–45,6%), baixo teor de lignina (6,7–13,9%) e 2,3% de cinzas. O sabugo do milho é formado por quatro partes distintas: palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula (Figura 6). A palha fina está na parte externa do sabugo e representa 4,1% de todo o seu peso. A palha grossa segue à palha fina e representa 33,7% do peso do sabugo de milho. O anel lenhoso apresenta-se no interior do sabugo com 60,3%, recobrendo a medula, que com 1,9% do peso total, é o núcleo central do sabugo (RAMOS, 2013).

Figura 6 – Corte transversal de um sabugo de milho mostrando sua estrutura e partes constituintes.



Fonte: RAMOS, 2013.

O Sisal (*Agave sisalana*) é uma planta originária do México que apresenta grande interesse ecológico e econômico, pois, se desenvolve o ano todo em climas quentes e regiões áridas (DEBNATH et al. 2010). É uma biomassa vegetal lignocelulósica que possui quantidades consideráveis de celulose (73,1%) e hemicelulose (14,2%), por isso, se mostra uma matéria-prima com potencial como fonte renovável para a geração de produtos de interesse industrial e para a produção de etanol celulósico, uma vez que, a partir da hidrólise liberam-se açúcares fermentescíveis (KUMAR; SHARMA, 2017).

Em 2011, a produção mundial de sisal atingiu 408.518 toneladas. Em 2017, os valores caíram para 202.223 toneladas, resultado da crise econômica global e da baixa valorização das matérias-primas comerciais (FAOSTAT, 2019).

Figura 7 – Plantação de sisal (*Agave sisalana*).



Fonte: QUEIROGA et al., 2021.

Essa planta oferece alta produtividade e baixo custo, além de, apresentar maior teor de celulose e de hemicelulose do que bagaço da cana-de-açúcar. O bagaço do sisal, que é a biomassa residual derivada da produção de fibras também apresenta altas quantidades de hemicelulose (22,91%) indicando que é uma boa alternativa para a produção de biocombustíveis (MEDEIROS et al., 2020).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) uma planta originária da América do Sul também conhecida por aipim e macaxeira, é a quarta cultura alimentar mais produzida no mundo. O maior produtor mundial é a Nigéria (59,49 milhões de toneladas), seguido por

República Democrática do Congo, Tailândia, Indonésia e Brasil (OTEKUNRIN; SAWICKA, 2019).

O uso industrial da mandioca, sobretudo na produção de farinha, provoca a formação de resíduos que são despejados em corpos d'água, poluindo, pois, são tóxicos e emanando fortes odores ofensivos. Ainda, a fabricação de outros derivados da mandioca gera cascas, entrecasas, raspas, pontas das raízes e farinha de varredura (manipueira) que podem ser aproveitados para produzir etanol celulósico, evitando assim o desperdício (CORREIA et al., 2018). Os resíduos de mandioca são compostos por 24,41% de lignina, 42,18% de hemicelulose e 20,48% de celulose (POLACHINI et al., 2020).

3.5 HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os componentes estruturais dos resíduos lignocelulósicos formam uma rede resistente e emaranhada difícil de ser hidrolisada. Devido a essa recalcitrância, há a necessidade da utilização de métodos de pré-tratamento para desestabilizar a estrutura lignocelulósica, para assim, ser desestruturada ou removida, facilitando o acesso de reagentes, catalisadores e enzimas à estrutura da celulose e, consequentemente, viabilizando o acesso aos monossacarídeos fermentescíveis e a conversão em etanol.

O pré-tratamento é um processo no qual os carboidratos, particularmente a celulose, ficam prontos para um ataque enzimático ou microbiano. Vários métodos de pré-tratamento têm sido pesquisados para que haja a deslignificação da estrutura lignocelulósica. Esses métodos podem ser químicos, físicos, físico-químicos (por exemplo, moagem, explosão a vapor, pré-tratamento ácido) ou biológicos (uso de enzimas, por exemplo), mas também, uma combinação desses.

O pré-tratamento físico geralmente se refere à redução do tamanho físico do material através de meios mecânicos para aumentar a área de superfície do substrato (ZHOU; LIU; ZHAO, 2021).

Dentre essas técnicas, os métodos químicos têm sido amplamente utilizados na hidrólise dos materiais celulósicos, pois, a lignina é removida sem degradar a cadeia celulósica. Porém, a lignina está fortemente ligada à hemicelulose, ocorrendo, assim, uma degradação parcial da hemicelulose no processo de pré-tratamento químico (BHATIA et al., 2020).

A hidrólise química pode ser à base de ácido, álcali, aplicação de ozônio, organo solventes e deslignificação oxidativa. Dessas, a hidrólise ácida e a hidrólise alcalina podem ser

utilizadas como hidrólise e pré-tratamento separadamente ou em conjunto com uma hidrólise biológica, como por exemplo, a hidrólise enzimática (TANG et al., 2021; YANG et al., 2021).

3.6 HIDRÓLISE ÁCIDA

O principal objetivo da hidrólise ácida é quebrar as ligações entre a celulose, hemicelulose e a lignina, romper as partes cristalinas da celulose e tornar a hemicelulose e a celulose acessíveis para a hidrólise enzimática ou separação. É uma técnica rápida e eficiente que, além, de resultar na formação de monômeros de açúcares, produz compostos aromáticos e ácidos orgânicos de baixo peso molecular (LORENCI WOICIECHOWSKI et al., 2020).

A metodologia da hidrólise ácida pode ser realizada com ácidos diluídos ou concentrados. Contudo, ao se utilizar ácidos concentrados há a formação de uma maior quantidade de compostos que podem ser inibidores para o processo de fermentação, sendo menos atrativa na produção de etanol (TANG et al., 2021; YANG et al., 2021).

Os ácidos diluídos não afetam a estrutura base da celulose, e na hidrólise da biomassa os catalisadores ácidos degradam as ligações heterocíclicas de éter entre os monômeros das cadeias poliméricas da celulose e da hemicelulose, resultando em altos teores de xilose, além de glicose e arabinose. Dentre os ácidos mais utilizados encontram-se: ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico, ácido fluorídrico, ácido acético e ácido nítrico (BHATIA et al., 2020).

A concentração mais eficaz do ácido diluído é geralmente inferior a 4,0% e o processo necessita de uma temperatura alta, como por exemplo, 180 °C, se realizado em um menor período de tempo. Ou temperaturas menores se ocorrer em um período de tempo maior, por exemplo, 120 °C para 30 – 90 min. (ZABED et al., 2017).

Temperaturas elevadas, como 170 °C, por exemplo, podem ocasionar a degradação dos açúcares resultando na formação de furfural e 5-hidroxi metilfurfural (HMF), ou de outros compostos que prejudicam o desenvolvimento dos micro-organismos na fermentação, uma vez que, são tóxicos para as leveduras e bactérias utilizadas na fermentação. Em geral, temperaturas mais altas favorecem a deslignificação, mas temperaturas acima de 170 °C causam maior perda de sólidos e glicose (MUÑOZ-PÁEZ et al., 2019).

A desidratação de uma hexose resulta em hidroximetilfurfural (HMF), e a hidrólise de pentoses em furfural. O HMF pode ser ainda decomposto por reidratação para produzir ácido levulínico e ácido fórmico. Esses produtos de degradação são produtos químicos importantes e têm muitas aplicações em química fina, farmacêutica, solventes,

combustíveis e polímeros. No entanto, eles são identificados como inibidores de muitos micro-organismos para a fermentação do açúcar. Além disso, a concentração ácida, o tempo e a temperatura de fermentação influenciam na formação dos compostos inibidores (ZHOU; LIU; ZHAO, 2021).

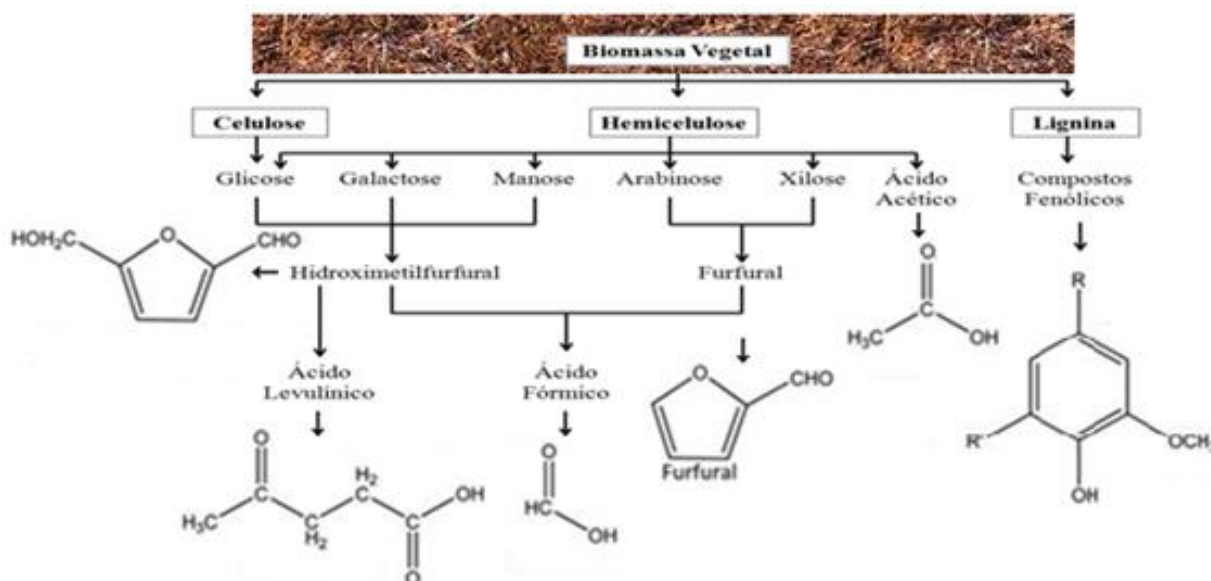
3.7 COMPOSTOS INIBIDORES

Durante o pré-tratamento ácido dos materiais lignocelulósicos, além da obtenção dos açúcares monoméricos, vários outros compostos são liberados e formados durante a liquefação da biomassa, como, ácidos carboxílicos (ácido fórmico, ácido acético e ácido levulínico) e derivados de furano (furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF)) (JONSSON et al., 2013).

Os micro-organismos utilizados em bioprocessos são afetados pelos subprodutos da hidrólise, os furfurais e furanos, sendo estes as principais toxinas que inibem fortemente a produção de hidrogênio em comparação com os ácidos fracos e os compostos fenólicos. O furfural e o HMF são os inibidores mais fortes do crescimento microbiano (MUÑOZ-PÁEZ et al., 2019).

A partir da degradação de um polímero lignocelulósico, a lignina permanecerá como um resíduo sólido, em que uma parte foi degradada em compostos fenólicos e outros compostos aromáticos. Quando em altas temperaturas e pressões os monossacarídeos (glicose, xilose, manose, galactose e arabinose), provenientes da celulose, podem ser convertidos a HMF e furfural e, quando esses compostos são clivados, geram ácidos carboxílicos (HAROUN et al., 2016). A presença e concentração destes compostos irão variar de acordo com a biomassa, pré-tratamento e condições de hidrólise utilizadas. As principais vias de formação desses compostos inibidores estão apresentadas na Figura 7.

Figura 8 – Representação das vias de formação de subprodutos da degradação da biomassa lignocelulósica durante o tratamento ácido.



Fonte: Adaptado de JONSSON et al., 2013.

Os subprodutos furfural e HMF inibem a glicólise prolongando a fase lag e prejudicando a atividade da enzima desidrogenase, o que reduz as taxas de crescimento e rendimentos celulares. Também prejudicam a parede e as membranas celulares dos micro-organismos, consequentemente, afetam a produção de etanol e outros subprodutos. Já, o ácido acético afeta o citosol devido à queda do pH, causando, interrupção da geração de energia. Os compostos fenólicos prejudicam integridade das membranas biológicas (SINGH et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

A tolerância da levedura a inibidores derivados de lignocelulósicos não depende apenas da cepa, mas também da fonte de carbono a ser fermentada. A levedura é muito mais afetada ao fermentar a xilose do que a glicose, uma vez que, a levedura mostra uma taxa de consumo de açúcar muito mais lenta para xilose e isso pode levar ao esgotamento dos principais metabólitos e cofatores que podem ser especialmente importantes em condições estressantes (MOYSES et al., 2016).

3.7.1 Ácidos carboxílicos

Quando os resíduos lignocelulósicos são hidrolisados há a formação de ácidos carboxílicos a partir da degradação de hemicelulose, tais como: ácido acético, levulínico e fórmico. O ácido acético é gerado a partir dos grupos acetil, enquanto, os ácidos levulínico e

fórmico são formados como produtos de degradação dos polissacarídeos catalisados por ácidos termoquímicos (JÖNSSON et al., 2013).

Esses ácidos são lipossolúveis e podem difundir-se através da membrana plasmática da célula reduzindo o pH intracelular e assim, dificultar a produção de energia e o transporte de nutrientes, aumentando a necessidade energética da célula. O ácido acético presente no meio de fermentação provoca queda na produtividade, no rendimento e no consumo de açúcar (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Quando o pH extracelular é menor que o pKa do meio com ácido (constante de dissociação logarítmica) pode haver um estresse ácido na célula, pois, significa que há muitas formas não dissociadas do ácido, que entram na célula e causam uma acidificação intracelular, impedindo assim, o crescimento das células e a formação de subprodutos (como o etanol), o que afeta o metabolismo celular. Portanto, o pH precisa ser maior que o pKa, indicando que, fora da célula há grande quantidade de ácido dissociado, o que, não é prejudicial quando comparado com a forma não dissociada do ácido. A produção de etanol é inibida a um pH igual ou menor do que o pKa 4,8 do ácido acético (NUGROHO et al., 2015).

3.7.2 Derivados de furanos

Os aldeídos derivados de furanos, o furfural e o HMF são aldeídos aromáticos geralmente originados de materiais lignocelulósicos a partir da degradação de pentoses e hexoses, respectivamente, por um processo de hidrólise na presença de calor. Esses compostos inibem a atividade enzimática, pois, rompem o DNA e impedem a síntese de RNA e de proteínas dos micro-organismos, afetando a geração de subprodutos como o etanol (JÖNSSON et al., 2013).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de converter o furfural em álcool furfurílico, em condições anaeróbias, e o HMF em 2,5-bis-hidroximetilfurano (PALMQVIST et al., 1999). Segundo o estudo de Wang et al. (2013) a *S. cerevisiae* pode degradar rapidamente o furfural e HMF, resultando em um aumento da produtividade de etanol e na taxa de consumo de glicose (WANG et al., 2013).

3.7.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são formados durante a hidrólise da lignina no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Alguns exemplos de compostos fenólicos são: seringaldeído,

ácido 4-hidroxibenzaldeído e 4-hidroxibenzóico e os ácidos: salicílico, vanílico, siríngico, gentísico, entre outros (WANG et al., 2017).

Esses compostos podem reagir com moléculas biológicas da célula (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) ou provocar danos à membrana celular, gerando perda da seletividade, e ainda inibem as enzimas glicolíticas e fermentativas no processo de fermentação alcoólica. Portanto, esses compostos causam efeitos negativos na fermentação por meio da diminuição da taxa específica de crescimento do micro-organismo e da redução da produtividade de etanol (BHATIA et al., 2020).

O processo de fermentação pode ser melhorado se os inibidores presentes forem identificados. A formação de inibidores pode diminuir devido à otimização do pré-tratamento e da hidrólise. Diferentes processos de desintoxicação específicos podem ser desenvolvidos para a remoção eficiente de inibidores antes de se proceder à fermentação (SANTANA et al., 2022). Portanto, a desintoxicação tem grande importância no processo de produção de etanol 2G.

3.8 DESINTOXICAÇÃO

Os métodos para desintoxicação do hidrolisado variam de acordo com o tipo de inibidor presente. Existe uma variedade de métodos químicos, biológicos e físicos que podem ser empregados para remover compostos tóxicos de hidrólises ou transformá-los em compostos não tóxicos. Entre os mais conhecidos (Tabela 2) encontram-se: mudanças de pH com óxido de cálcio, hidróxido de cálcio (*overliming*) e hidróxido de amônio; utilização de carvão ativado, colunas de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, evaporação, peneiras moleculares e até aplicação de enzimas (ZHANG et al., 2018).

Pesquisas comparando esses métodos informam que eles diferem significativamente em relação aos efeitos sobre a química do hidrolisado e sobre a fermentação, e também mostram que um dos métodos mais eficientes é o *overliming*, devido à precipitação eficiente das substâncias tóxicas, que, em muitos casos, se apresenta como o método mais econômico (JÖNSSON et al., 2013). Entretanto, um dos processos de desintoxicação que apresenta vantagens em sua utilização para hidrolisados ácidos é o uso do procedimento químico com adição de carvão ativado (BHATIA et al., 2020).

O carvão ativado é um material poroso de origem vegetal, cujo tratamento é baseado na elevada capacidade que esse material tem de adsorver diferentes tipos de moléculas que

ficam presas em sua superfície devido a interações físicas fracas chamadas de Van der Waals (KIM et al., 2013).

Tabela 2 – Métodos que podem ser utilizados na desintoxicação de hidrolisados lignocelulósicos.

Técnica	Procedimento
Aditivos químicos	Alcalino (como Ca(OH)_2 , NaOH , NH_4OH)
	Agentes redutores (tais como ditionito, ditioneitol, sulfito)
	Lacase
Tratamento enzimático	Peroxidase
	Evaporação
Aquecimento e vaporização	Tratamento de calor
	Acetato de etila
Extração líquido-líquido	Extração com fluido supercrítico (exemplo CO_2 supercrítico)
Extração líquido-sólido	Carvão ativo
	Troca iônica
Tratamento microbiano	<i>Coniochaeta ligniaria</i>
	<i>Trichoderma reesei</i>
	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>

Fonte: Adaptado de JÖNSSON et al. (2013).

Ainda que os métodos de desintoxicação possam remover de forma eficiente os compostos tóxicos, é importante mencionar que poderá ocorrer a redução substancial da concentração de açúcar, aumentar os custos e gerar resíduos, o que pode tornar essa etapa adicional economicamente indesejável (ZHANG et al., 2018).

Os métodos biológicos ou os físico-químicos são abordagens essenciais para reduzir a concentração de compostos inibidores de fermentação para a máxima utilização dos açúcares fermentescíveis pela cepa microbiana utilizada (ARUMUGAM; ANANDAKUMAR, 2016).

3.9 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL

A fermentação alcoólica pode ser realizada por bactérias ou leveduras que metabolizam e convertem açúcares como glicose, frutose, manose, xilose e arabinose em etanol. Os micro-organismos mais utilizados para a obtenção de etanol são as leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp., *Pichia* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp. e *Pachysolen* sp.; fungos filamentosos: *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Monilia* sp. e *Paecilomyces* sp.; e bactérias: *Clostridium* sp., *Bacillus* sp., *Thermoanaerobacter* sp., *Klebsiella* sp. e *Zymomonas mobilis* (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

A *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais utilizada no mundo para a produção de etanol em escala industrial e em uma série de outros processos biotecnológicos, como, na fabricação de pão e bebidas alcoólicas, como cerveja e vinho, pois, ela oferece rápido desenvolvimento e alta eficiência fermentativa (TOOGOOD; SCRUTTON, 2018). Suas colônias são esféricas e as cores variam entre o branco e o creme com estruturas convexas e lisas (MARTIN; ARKOWITZ, 2014).

Essa levedura codifica a enzima invertase, que é a responsável pela hidrólise da sacarose em frutose e glicose. Desta forma, a glicose segue a via da fermentação alcoólica, que ocorre em anaerobiose, passando por várias reações específicas até ser convertida em etanol. A *S. cerevisiae* é mesofílica com tolerância a grandes variações de temperatura, seu crescimento ótimo está entre 30 e 35 °C. Além de alta produção, também apresenta resistência ao etanol, e é tolerante a baixos valores de pH suportando meios acidificados, também, tolera oxigênio, altas concentrações de açúcares e é insensível à infecção por bacteriófagos, o que é particularmente relevante em grandes processos industriais (RUCHALA et al., 2020).

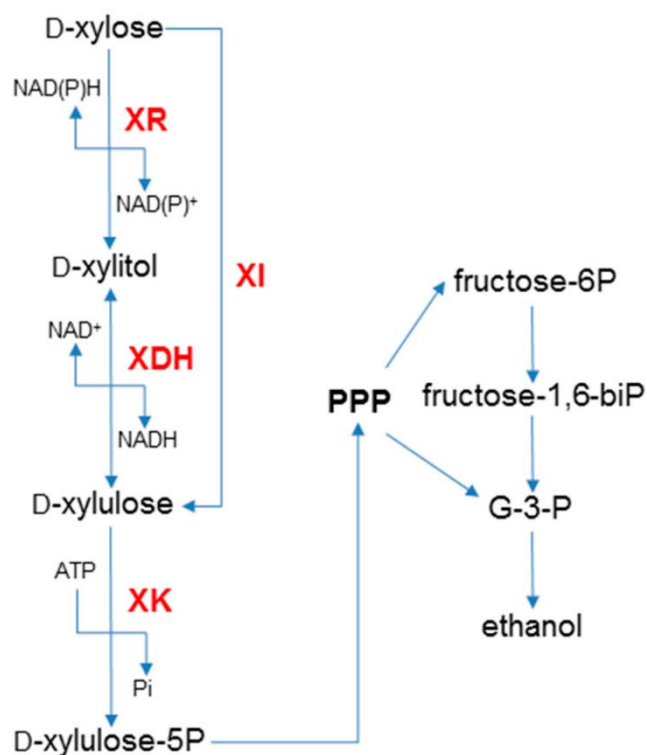
Em pesquisas realizadas na Universidade de Coimbra – Portugal, a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602 foi empregada em lamas primárias da indústria papeleira, um meio rico em celulose, hemicelulose e impurezas. Essa estirpe se destacou com ótima produção de etanol à 30 °C (MENDES, et al., 2016), motivo pelos quais foi utilizada nesta pesquisa.

No entanto, essa levedura não fermenta pentoses facilmente. Apresenta a capacidade de metabolizar lentamente o cetoisômero da xilose, a xilulose, A *S. cerevisiae* possui 18

transportadores de hexose capazes de transportar glicose para dentro da célula. Eles são divididos em três tipos de transportadores de glicose de acordo com suas afinidades pela glicose, em alta, intermediária e baixa. Os transportadores são flexíveis quanto à xilose, captando essa pentose com afinidade 200 vezes menor em taxas mais lentas, dependendo da concentração de xilose e glicose fora da célula. Os transportadores de alta e média afinidade parecem ser os principais transportadores responsáveis pela captação de xilose quando a xilose é a única fonte de carbono disponível ou quando a glicose atinge níveis baixos (SEDLAK; HO, 2004).

A D-xilose é o maior produto da hidrólise da hemicelulose de vários materiais vegetais, representa até 35%. Em geral, as leveduras convertem a xilose à xilulose em uma reação de duas etapas mediada por oxido-redutases. Em primeiro lugar, a xilose é reduzida a xilitol por uma xilose redutase (XR) ligada a NADPH/NADH, seguida de oxidação de xilitol em xilulose por uma xilitol desidrogenase (XDH) ligada a NAD (VAN AALST et al. 2022). Em subsequência a xilulose é fosforilada pela xiluloquinase para formar xilulose-5-fosfato, que é canalizado para a via das pentoses-fosfato (LI et al., 2019). Este esquema está apresentado na Figura 8.

Figura 9 – Esquema da via de conversão da xilose em etanol.



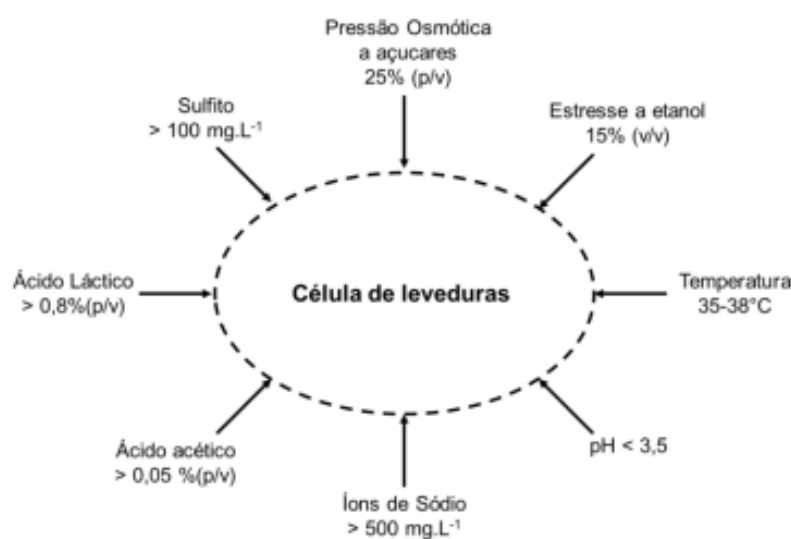
As limitações da utilização de xilose em células de *S. cerevisiae* são muito provavelmente causadas por uma capacidade insuficiente da via não-oxidativa das pentoses-

fosfato, como indicado pelo acúmulo de sedo-heptulose-7-fosfato e ausência de acúmulo de frutose-1,6-bifosfato e piruvato (KOTTER et al., 1993).

Assim, uma cepa de *S. cerevisiae* modificada para utilizar xilose deve ser viável. Por isso, são pesquisadas e desenvolvidas cepas geneticamente modificadas capazes de produzir etanol a partir de xilose (ZHANG et al., 2016).

Ainda que a levedura não converta pentoses, ela é considerada vantajosa para a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos. Isso se deve essencialmente a tolerância da *S. cerevisiae* aos compostos formados durante a fermentação, que podem causar inibição microbiana, e à capacidade de suportar concentrações mais elevadas de etanol. Enquanto, as leveduras fermentativas não conseguem mais se desenvolver a partir de 6,0% (v/v), a *S. cerevisiae* cresce em concentrações de etanol de 17,0% (v/v) ou superiores (SANTOS et al., 2010). Na Figura 9 estão resumidos os parâmetros de tolerância que podem ser encontrados no meio de fermentação que essa levedura pode suportar.

Figura 10 – Efeitos dos parâmetros encontrados no meio de fermentação sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG (2008).

É essencial recorrer a leveduras que também tenham capacidade de consumir xilose. Alguns micro-organismos apresentam a capacidade de assimilar esta pentose, como a *Scheffersomyces (Pichia) striptis*, *Pachysolen tannophilus* e *Candida shehatae*, porém, elas apresentam baixa tolerância aos inibidores e baixo rendimento de produção (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008; TIAN et al., 2009).

A levedura *P. tannophilus* apresenta capacidade natural de fermentar e converter a xilose diretamente em etanol, uma característica potencialmente valiosa. Essa levedura utiliza aerobicamente a xilose, glicose e frutose, após adaptação também assimila galactose. Para a *P. tannophilus* a temperatura ideal é de 30 °C e o pH indicado é 6,0 (CONVERTI et al., 2001).

Uma técnica que pode ser utilizada para o aproveitamento total dos açúcares presentes no meio hidrolisado é a utilização de dois micro-organismos simultaneamente ou separadamente no mesmo processo, o que é chamado de co-cultura, culturas mistas ou co-fermentação, desde que haja ação sinérgica das vias metabólicas entre as cepas (SEDLAK; HO, 2004; SHADBAHR et al., 2017; JIANG et al., 2019). O principal objetivo ao empregar co-culturas na produção de etanol é combinar uma levedura fermentadora de pentoses e outra de hexoses para o aproveitamento destes açúcares obtidos na hidrólise dos materiais lignocelulósicos (DA CUNHA PEREIRA et al., 2011).

Este tipo de fermentação pode ser realizado em um único biorreator, consequentemente gera menores custos operacionais e, também apresenta menos problemas que causam inibição pelo substrato, tendo em vista que os açúcares fermentáveis são consumidos pelo consórcio durante a produção de etanol (TRAKARNPAIBOON et al., 2017).

Por esse motivo a levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 foi empregada nesta pesquisa em co-cultura com a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

Os sabugos de milho (*Zea mays* L), a planta de sisal (*Agave sisalana*) e os resíduos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) foram obtidos de produtores rurais da cidade de São José do Rio Preto – SP.

4.2 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

O tamanho da biomassa foi homogeneizado manualmente com auxílio de um facão em pedaços menores que 3 cm², distribuídos em bandejas de inox e expostos ao sol durante 24 h ou até ficarem duros e quebradiços. Em seguida foram moídos em um moedor de facas, então, este triturado foi peneirado (14 mash), acondicionado e armazenado em frascos de vidro vedados a temperatura ambiente.

4.3 HIDRÓLISE ÁCIDA DA BIOMASSA

A hidrólise ácida foi realizada utilizando 10 g de cada biomassa seca e 100 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0%, respectivamente, com subsequente aquecimento em autoclave a 121 °C durante 15 e 30 min.

Após a hidrólise o pH foi neutralizado, até pH 7,0, utilizando uma solução de NaOH a 50% (m/v). A seguir, o hidrolisado foi filtrado em papel filtro Whatman n°.1 para separação dos sólidos, os quais foram descartados, permanecendo somente o sobrenadante. Nesse, foram analisadas as concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e compostos fenólicos, conforme descrito nos itens 4.10.4, 4.10.5 e 4.10.6, respectivamente.

4.4 DESINTOXICAÇÃO DO HIDROLISADO

O processo de desintoxicação foi realizado de acordo com Mussatto e Roberto (2004). Primeiramente, foram adicionados 2,5% de carvão ativado ao hidrolisado, e a mistura foi submetida à agitação de 200 rpm, a 30 °C, por 1 h. A mistura foi centrifugada (6000 g, 15 min.) e filtrada. Posteriormente, foram novamente realizadas análises de açúcares totais, redutores e compostos fenólicos, conforme descrito nos itens 4.10.4, 4.10.5 e 4.10.6, respectivamente.

4.5 MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizadas as leveduras *Pachysolen tannophilus* CCT 1891, adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, SP e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 (American Type Culture Collection, Virginia, EUA) cedida pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra de Portugal.

4.6 MEIOS DE CULTURA

4.6.1 Meio de manutenção

As leveduras foram mantidas em geladeira a 4 °C, após o crescimento em estufa a 30 °C por até 24 h. Para *Pachysolen tannophilus* foi utilizado o meio contendo (g.L⁻¹): 10,0 de xilose, 2,0 de extrato de levedura, 3,0 de extrato de malte e 5,0 de peptona e ágar, pH 6,0-7,0. Para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 o meio utilizado foi o mesmo, apenas a fonte de carbono foi glicose (10 g.L⁻¹). Ambos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. Foi realizado um estoque de trabalho armazenado em freezer a 0 °C para retiradas periódicas durante toda a pesquisa.

4.6.2 Propagação/Ativação das culturas e preparo do inóculo

As leveduras foram inoculadas assepticamente, separadamente, em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de manutenção e incubadas em estufa a 30 °C, por 24 h. Em seguida, o crescimento celular de cada tubo foi transferido para diferentes frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de manutenção (sem adição de ágar) previamente esterilizado, e incubado a 30 °C, por 24 h com agitação de 100 rpm.

4.6.3 Padronização do inóculo

Para a realização das fermentações o inóculo utilizado foi padronizado para garantir que a concentração inicial deste seja igual para todos os ensaios da fermentação. A suspensão celular obtida no item 4.6.2 foi centrifugada a 6000 rpm por 15 min., para separação das células. Essas foram ressuspensas em água destilada estéril e, a seguir, com auxílio de um espectrofotômetro (Biochrom modelo: Libra 22), e por meio de uma regra de três foi determinada a concentração da suspensão celular a ser inoculada para cada frasco de

Erlenmeyer contendo o meio a ser fermentado, de forma a se obter uma absorbância da ordem de 0,6 em um comprimento de onda de 600 nm.

Separadamente foi construída uma curva padrão com diferentes concentrações da suspensão celular com cada levedura, *S. cerevisiae* ATCC 26602 e *P. tannophilus* CCT 1891, que relacionaram a absorbância com a concentração celular (g.L^{-1}).

4.6.4 Curva padrão de calibração para a determinação da concentração celular a partir de suspensões das leveduras

Para a construção da curva de calibração, inicialmente o micro-organismo foi cultivado nas condições de pré-fermentação, em um volume de 100 mL de meio, conforme descrito no item 4.6.2, a seguir foi centrifugado a 3600 rpm durante 15 min.

Após a centrifugação, a massa celular foi ressuspensa em 50 mL de água destilada, que consistiu na suspensão original e posteriormente, foram preparadas diferentes diluições. Um volume de 10 mL da diluição original e de cada diluição da suspensão de células foi adicionado em cadinhos de porcelana, que foram previamente secos e pesados em balança analítica. Em paralelo, foram feitas leituras da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, na amostra da suspensão celular original e nas diluídas.

Estes cadinhos foram secos em estufa a 105 °C até que seu peso se estabilizasse e novamente pesados. O peso celular seco foi calculado por subtração. Com base nas absorbâncias medidas das amostras e a massa celular seca pesada, foi construída a curva de calibração, relacionando a absorbância com a concentração celular (Anexo: Tabelas 13 e 14. Figuras 25 e 26).

4.7 MEIOS DE FERMENTAÇÃO

A produção de etanol foi realizada com o uso dos seguintes meios de fermentação:

4.7.1 Meio Sintético

Para os ensaios utilizando *P. tannophilus* o meio apresentou glicose ou xilose nas concentrações de 2,0, 4,0 e 6,0%. Para a levedura *S. cerevisiae* foi usada apenas glicose nas concentrações de 2,0, 4,0 e 6,0%.

As soluções de glicose e xilose foram esterilizadas separadamente a 121 °C/1.1 atm., para evitar o desenvolvimento da reação de Maillard. Durante 20 min., e depois de resfriadas

até a temperatura ambiente, foram misturadas assepticamente no meio sintético contendo sais minerais. O pH inicial do meio foi ajustado a 5,5; 6,0 e 6,5.

A composição do meio de sais foi (g.L^{-1}): extrato de levedura, 5,0; KH_2PO_4 , 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0.

4.7.2 Meio contendo os hidrolisados de sabugo de milho, sisal e resíduos de mandioca usados como fonte de carbono

O Teor de açúcares redutores (dosados conforme descrito no item 4.10.5) nos hidrolisados foi ajustado nas concentrações usadas como padrão de 2,0; 4,0 e 6,0%. Os frascos de Erlenmeyer contendo os hidrolisados com as concentrações adequadas, tiveram o pH inicial do meio ajustado para 5,5; 6,0 e 6,5; e foram esterilizados a $121\text{ }^\circ\text{C}/1.11\text{ atm.}$, por 20 min., em seguida, foi adicionado o meio de sais estéril até completar o volume desejado.

4.8 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

4.8.1 Avaliação das variáveis que influenciam a produção de etanol: tempo de incubação, velocidade de agitação e efeito do pH

As condições de trabalho das leveduras foram determinadas utilizando primeiramente o meio sintético, acrescido de glicose e/ou xilose, durante uma fermentação de 24 horas, retirando amostras a cada hora. Os cultivos foram realizados em triplicata, em agitador orbital rotatório com temperatura controlada ($30\text{ }^\circ\text{C}$).

Assim, foi determinado o melhor tempo de fermentação, durante as 24 horas, a melhor forma de agitação, por meio de três maneiras diferentes: estática (0 rpm), e com agitação de 50 e 100 rpm; também foram analisadas as diferentes concentrações do açúcar (20; 40 e 60 g.L^{-1}) e diferentes pH iniciais (5,5; 6,0 e 6,5).

A matriz do planejamento experimental, que contemplou as 9 combinações em triplicata, para cada fermentação, foi empregada o utilizando o software Statistica 7.0, a partir de um delineamento do tipo 2^3 (BOX; HINTER, 1978) com 11 pontos. A Tabela 3 apresenta como foi realizado o planejamento estatístico das variáveis independentes e seus respectivos níveis.

Tabela 3 – Delineamento experimental, contendo as variáveis independentes, estudadas para a produção de etanol pelas leveduras *S. cerevisiae* e *P. tannophilus*, variando a concentração de açúcares, a agitação e o pH.

Fator	Níveis/Variáveis		
	-1	0	1
Concentração de substrato (g/L)	20	40	60
Agitação (rpm)	0	50	100
pH	5,5	6,0	6,5

4.8.2 Avaliação das fermentações utilizando os hidrolisados

As fermentações utilizando os hidrolisados foram realizadas nas melhores condições encontradas no item 4.8.1, para produção de etanol (tempo, velocidade de agitação e pH).

Nos hidrolisados foram usadas diferentes concentrações de açúcares redutores (2,0; 4,0 e 6,0%), e foi determinado o pH final. As fermentações foram conduzidas em agitador orbital rotatório com temperatura controlada (30 °C) em triplicata. Ao final das fermentações foi determinada a concentração de etanol produzido.

4.9 CO-CULTURA

Os ensaios de co-fermentação das leveduras foram avaliados por dois métodos. O primeiro (co-cultura 1) foi realizado com inoculação simultânea de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* no início do processo fermentativo, a fermentação foi conduzida em Erlenmeyers, contendo 50 mL do meio de fermentação, incubados em shaker, a 30 °C, sem agitação e com agitação de 50 e 100 rpm durante 24 h.

No segundo método (co-cultura 2) a *S. cerevisiae* foi inoculada no início da fermentação, durante um tempo pré-determinado, a 30 °C, depois desse tempo o caldo fermentado foi centrifugado, assepticamente, para remoção das células da *S. cerevisiae*, e então a *P. tannophilus* foi inoculada.

4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.10.1 Determinação do pH

O pH final foi determinado diretamente no caldo fermentado utilizando o potenciômetro pHmetro Digmed modelo DM20.

4.10.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por meio das medidas de densidade ótica a 600 nm no espectrofotômetro Biochrom, modelo Libra S22. Para isto, as células contidas nos hidrolisados fermentados foram separadas como descrito no item 4.6.3 e quantificadas com a curva de calibração construída para determinar a quantidade de crescimento da levedura (item 4.6.4)

4.10.3 Determinação de etanol

O etanol foi determinado nos hidrolisados fermentados por cromatografia gasosa, após separação das células por centrifugação, utilizando cromatógrafo Thermo Scientific Modelo Focus com detector de ionização de chamas (FID) e coluna HP-FFAP (25 m x 0.2 mm x 0.3 µm); temperatura do forno a 70 °C (mantendo esta temperatura por toda a corrida-isotérmica); tempo da corrida de 5 min.; temperatura do injetor de 230 °C; temperatura do detector de 270 °C; injeção de 200 µl de vapor da amostra. As amostras foram deixadas em banho-maria em uma temperatura de 40 °C (até atingir o equilíbrio). Para quantificação foi criada uma curva de calibração.

4.10.4 Determinação de açúcares totais (AT)

Os açúcares totais (AT) foram determinados pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956). Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda de 490 nm, e a quantificação foi determinada por curva padrão de glicose em diferentes concentrações.

4.10.5 Determinação de açúcares redutores (AR)

Os açúcares redutores (AR) foram determinados de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Nelson (1944) e Somogyi (1952). Foram realizadas leituras de

absorbância no comprimento de onda de 540 nm, e a quantificação foi determinada por curva padrão de glicose utilizando diferentes concentrações.

4.10.6 Determinação do teor de compostos fenólicos

A concentração de fenóis totais foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu modificado por Chaovanalikit e Wrolstad (2004). Onde, uma amostra de 0,5 mL do hidrolisado foi misturada com 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de água destilada. A mistura foi deixada em repouso por 10 min., à temperatura ambiente. Depois foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio (20%), as amostras ficaram em repouso novamente, por 20 min., a 40 °C. Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda de 755 nm. Foi construída uma curva de calibração utilizando ácido vanílico como padrão de identificação.

4.11 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS POR CLAE

A análise do ácido ferúlico e seus metabólitos foi realizada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A cultura foi centrifugada a $15000 \times g$ por 15 min., o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 μm , e 20 μL foi injetado no cromatógrafo Agilent Tec., modelo 1220 Infinity LC, equipado com bomba binária, amostrador automático, forno de coluna e um detector UV/VIS. A coluna usada foi uma C18 ZORBAX Eclipse Plus (4.6x250 mm), mantida a temperatura de 25 °C. A separação cromatográfica realizada utilizando fase móvel metanol:ácido acético:água (10:2:88 v/v) como solvente “A” e metanol:ácido acético:água (90:2:8 v/v) como solvente “B” (RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2001).

Os tempos de retenção de cada composto foram determinados e as curvas de calibração foram realizadas nas concentrações de 2,5 a 300 mg.L⁻¹, o coeficiente de correlação foi de 0,999 para os compostos estudados. Tal coeficiente indicou que a metodologia utilizada neste trabalho teve um bom desempenho na quantificação dos padrões utilizados.

4.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise dos resultados e os efeitos principais e interações entre as variáveis do planejamento fatorial foram realizados utilizando o programa computacional Statistica 7.0 (STATSOFT, 1996). Os resultados das variáveis analisadas foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), e, quando apresentou diferença estatística, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.12.1 Cálculo da produtividade

Os valores de produtividade total de etanol, expressos em massa do produto formado por unidade de tempo e por unidade de volume ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), foram obtidos por meio da Equação 1.

$$P = \frac{(P_f - P_o)}{(t_f - t_o)} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

P = produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

P_o = massa produto inicial (g.L^{-1});

P_f = massa de produto final (g.L^{-1});

t_f = tempo final de fermentação (h);

t_o = tempo inicial de fermentação (h);

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 HIDRÓLISE DA BIOMASSA

A biomassa lignocelulósica é composta por uma grande quantidade de celulose, hemicelulose e lignina que formam uma rede rígida difícil de ser rompida. Portanto, é necessário diminuir o tamanho de partícula realizando, primeiramente, um pré-tratamento físico por meio da moagem mecânica, para aumentar a área de contato e diminuir o tamanho dos poros, a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose (AGRAWAL et al., 2021; SONG et al., 2021). Além disso, existe a necessidade de realizar um pré-tratamento. Entre os vários tipos de tratamentos da biomassa, o do ácido diluído é um dos métodos mais antigos e mais utilizado, uma vez que satisfaz a maioria dos requisitos dos processos de pré-tratamento e ainda, apresenta baixo custo (LOOW et al., 2016; BHATIA et al., 2020).

Quando a biomassa lignocelulósica é fragmentada pelo pré-tratamento ácido, a celulose, a hemicelulose e a lignina liberam açúcares capazes de serem fermentados e convertidos a etanol, principalmente a glicose e a xilose. Portanto, a etapa de pré-tratamento ácido dos resíduos é essencial para a produção de etanol, já que, a resistência natural da estrutura da biomassa limita o acesso de enzimas à sua matriz (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

Neste trabalho, todos os ensaios de hidrólise ácida foram realizados em triplicata a fim de se obter açúcares fermentescíveis para serem utilizados pelas leveduras para a produção de etanol por fermentação submersa. Para isto, as hidrólises foram realizadas com diferentes concentrações de H_2SO_4 (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0%) e aquecimento (15 e 30 min.), em autoclave na temperatura de 121°C/1,1 atm.

Após esses tratamentos, foram quantificadas as concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e compostos fenólicos obtidos durante as hidrólises e serviram para a avaliação do desempenho da hidrólise e para seleção da concentração de ácido que gerou mais açúcares fermentescíveis e menos compostos fenólicos, que são inibidores da fermentação.

5.1.1 Sabugo de milho

Em pesquisa anterior Silva et al., (2020) realizaram a hidrólise do sabugo de milho utilizando concentrações de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2,5 e 5,0% e observaram que a concentração máxima de açúcares totais foi de 37,52 g.L⁻¹ usando 2,5% de H_2SO_4 e tratamento térmico durante 30 min. Com base nesses resultados, foram realizadas hidrólises ácidas do

sabugo de milho em intervalos menores entre 0,0 até 5,0%, para determinar a existência de uma concentração mais eficiente na liberação de açúcares (Tabela 4). Nesta estão apresentados as médias e os desvios padrão de todas as análises realizadas (açúcares totais, redutores e compostos fenólicos), utilizando tratamento térmico de 15 min.

Tabela 4 – Média e desvios padrão de todas as análises realizadas (açúcares totais, redutores e compostos fenólicos em g.L⁻¹) para os hidrolisados de sabugo de milho durante a hidrólise ácida e 15 min. de tratamento térmico (121 °C/1.1 atm.).

[H ₂ SO ₄]	Açúcares totais (g.L ⁻¹)		Açúcares redutores (g.L ⁻¹)		Compostos Fenólicos (g ác. vanílico/g)	
	Bruto	Desintoxicado	Bruto	Desintoxicado	Bruto	Desintoxicado
0,0	2,79 ± 0,09 ^g	2,87 ± 0,14 ^d	0,63 ± 0,01 ^g	0,31 ± 0,02 ^e	0,32 ± 0,00 ^g	0,07 ± 0,01 ^e
0,5	30,48 ± 0,98 ^{ef}	32,55 ± 1,18 ^{bc}	9,41 ± 0,08 ^f	26,56 ± 0,22 ^{bc}	1,28 ± 0,00 ^{ef}	0,61 ± 0,02 ^{ab}
1,0	35,88 ± 0,66 ^{bd}	36,40 ± 1,81 ^{ac}	14,48 ± 0,21 ^e	33,08 ± 0,81 ^a	1,23 ± 0,01 ^f	0,37 ± 0,02 ^c
1,5	28,10 ± 0,59 ^f	31,58 ± 3,34 ^c	17,35 ± 0,28 ^e	34,05 ± 0,52 ^a	1,49 ± 0,04 ^{de}	0,64 ± 0,03 ^a
2,0	34,37 ± 0,40 ^{cd}	39,47 ± 2,70 ^a	32,42 ± 1,29 ^b	22,35 ± 1,91 ^d	1,97 ± 0,02 ^{bc}	0,51 ± 0,08 ^b
2,5	39,99 ± 1,16 ^a	39,75 ± 1,12 ^a	35,57 ± 0,18 ^a	27,69 ± 1,01 ^b	1,77 ± 0,04 ^c	0,54 ± 0,02 ^b
3,0	38,78 ± 2,54 ^{ab}	37,06 ± 1,61 ^{ab}	24,80 ± 2,16 ^c	22,37 ± 1,92 ^d	2,47 ± 0,15 ^a	0,63 ± 0,01 ^a
3,5	38,94 ± 1,81 ^{ab}	40,06 ± 0,47 ^a	25,85 ± 1,29 ^c	23,40 ± 0,48 ^d	2,03 ± 0,15 ^b	0,56 ± 0,03 ^{ab}
4,0	33,88 ± 1,70 ^{cde}	32,92 ± 0,58 ^{bc}	24,99 ± 1,61 ^c	23,95 ± 0,71 ^{cd}	1,28 ± 0,05 ^{ef}	0,20 ± 0,00 ^d
4,5	37,22 ± 0,92 ^{abc}	37,39 ± 1,79 ^{ab}	26,08 ± 0,56 ^c	22,30 ± 1,05 ^d	1,52 ± 0,03 ^d	0,37 ± 0,01 ^c
5,0	34,89 ± 0,97 ^{cd}	39,55 ± 0,58 ^a	20,51 ± 0,17 ^d	22,41 ± 0,29 ^d	1,31 ± 0,09 ^{df}	0,56 ± 0,01 ^{ab}
Erro Padrão	1,767	1,812	1,715	1,490	0,095	0,032
P-Valor	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01

^{a-b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre si ($P < 0,05$);

Os resultados mostrados na Tabela 4 constataam que a concentração de 2,5% de ácido sulfúrico para a análise de açúcares totais (AT) foi diferente de todos os outros valores encontrados para o hidrolisado bruto (HB), já, para o hidrolisado desintoxicado (HD) a concentração de 2,5% não apresentou diferença significativa em relação à de 2,0%, porém, a análise pode ter detectado outro composto no mesmo comprimento de onda, pois, o teor de AT do HD está mais elevado do que o do HB na concentração de 2,0%. Este mesmo comportamento ocorreu na análise de açúcares redutores (AR) para o HD. Para todas as concentrações testadas houve diferenças significativas entre elas ($P < 0,05$).

Na Tabela 4 também se observa que o maior teor de AT liberado ocorreu na concentração de 2,5% de H_2SO_4 durante 15 min. de tratamento térmico, sendo de 39,99 g.L^{-1} e, após a desintoxicação diminuiu para 39,75 g.L^{-1} de AT. Esse resultado confirma o teor de 37,52 g.L^{-1} da pesquisa previamente realizada. Entretanto, o tempo de processo foi menor, pois esse resultado foi obtido com um tratamento térmico de 30 min. (SILVA et al., 2020).

Na análise de AR foi verificado que a concentração de 2,5% foi maior que às outras concentrações, com 35,57 g.L^{-1} para o HB e 27,69 g.L^{-1} após a desintoxicação.

A Tabela 5 apresenta as médias e desvios padrão para a hidrólise ácida com aquecimento por 30 min.

Tabela 5 – Média e desvios padrão de todas as análises realizadas (açúcares totais, redutores e compostos fenólicos) para os hidrolisados de sabugo de milho durante a hidrólise ácida e 30 min. de tratamento térmico (121 °C/1.1 atm.).

[H_2SO_4]	Açúcares totais (g.L^{-1})		Açúcares redutores (g.L^{-1})		Compostos Fenólicos (g ác. vanílico/g)	
	Bruto	Desintoxicado	Bruto	Desintoxicado	Bruto	Desintoxicado
0,0	2,15±0,14 ^e	2,04±0,09 ^g	0,28±0,00 ^e	0,64±0,04 ^f	0,32 ± 0,00 ^d	0,05±0,01 ^d
0,5	25,71 ± 0,66 ^c	12,75±0,69 ^f	31,42±0,16 ^a	29,88±0,08 ^a	1,07 ± 0,04 ^c	0,65±0,02 ^{abc}
1,0	21,56 ± 0,80 ^{cd}	13,36±0,69 ^f	32,33±0,16 ^a	29,63±2,92 ^a	1,04 ± 0,03 ^c	0,61±0,02 ^{abc}
1,5	28,46 ± 0,87 ^{bc}	22,35±0,31 ^e	29,35±0,12 ^b	29,21±0,12 ^a	1,82 ± 0,05 ^a	0,88±0,00 ^{ab}
2,0	34,41 ± 0,55 ^a	28,58±2,34 ^{cd}	31,05±0,42 ^a	31,05±0,70 ^a	1,83 ± 0,09 ^a	1,02±0,31 ^a
2,5	23,76 ± 3,25 ^c	25,23±2,46 ^{de}	28,55±0,44 ^b	22,49±0,27 ^b	1,05 ± 0,06 ^c	0,61±0,44 ^{abc}
3,0	17,93 ± 2,00 ^d	25,48±0,48 ^{de}	28,20±0,59 ^b	21,93±0,68 ^{bc}	1,96 ± 0,04 ^a	0,85±0,02 ^{ab}
3,5	32,36 ± 1,31 ^{ab}	34,32±1,62 ^{ab}	20,06±0,41 ^d	18,70±0,91 ^d	1,25 ± 0,08 ^{bc}	0,48±0,01 ^{bcd}
4,0	31,80 ± 1,53 ^{ab}	32,53±4,04 ^{abc}	23,05±0,66 ^c	19,22±0,52 ^{cd}	0,52 ± 0,00 ^d	0,35±0,01 ^{cd}
4,5	30,99±1,26 ^{ab}	29,47±0,18 ^{bcd}	23,02±0,97 ^c	19,04±0,94 ^{cd}	1,21±0,03 ^{bc}	0,47±0,02 ^{bcd}
5,0	29,22 ± 2,07 ^{bc}	35,29±1,73 ^a	21,16±0,38 ^d	10,92±0,82 ^e	1,34 ± 0,01 ^b	0,76±0,06 ^{abc}
Erro Padrão	1,560	1,775	1,535	1,564	0,089	0,052
P – Valor	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01

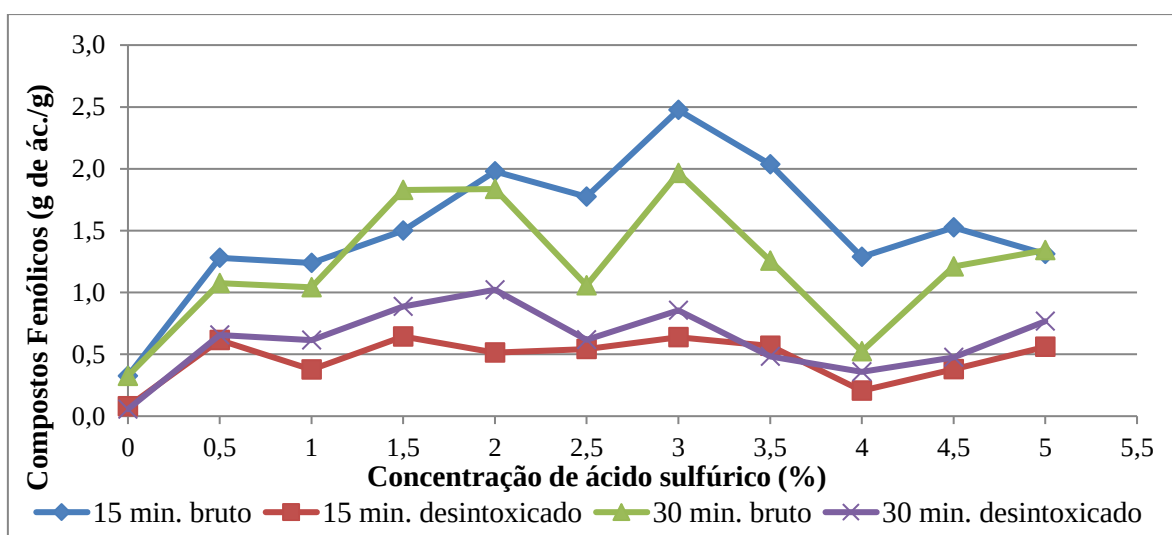
^{a-b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre si ($P < 0,05$);

Os hidrolisados submetidos ao processo de 30 min. de aquecimento em autoclave (121 °C) apresentaram teores discrepantes entre as concentrações testadas. O maior teor de AT obtido foi em 2,0% (34,41 g.L^{-1}). No tempo de aquecimento de 15 min. nessa mesma concentração (2,0%) foi obtida a mesma quantidade de AT (34,37 g.L^{-1}), porém, em 2,5% foi obtido o maior

teor ($39,99 \text{ g.L}^{-1}$) para o HB. Portanto, é mais vantajoso utilizar menor tempo de aquecimento (Tabela 4) e evitar maior formação de CF (Tabela 5).

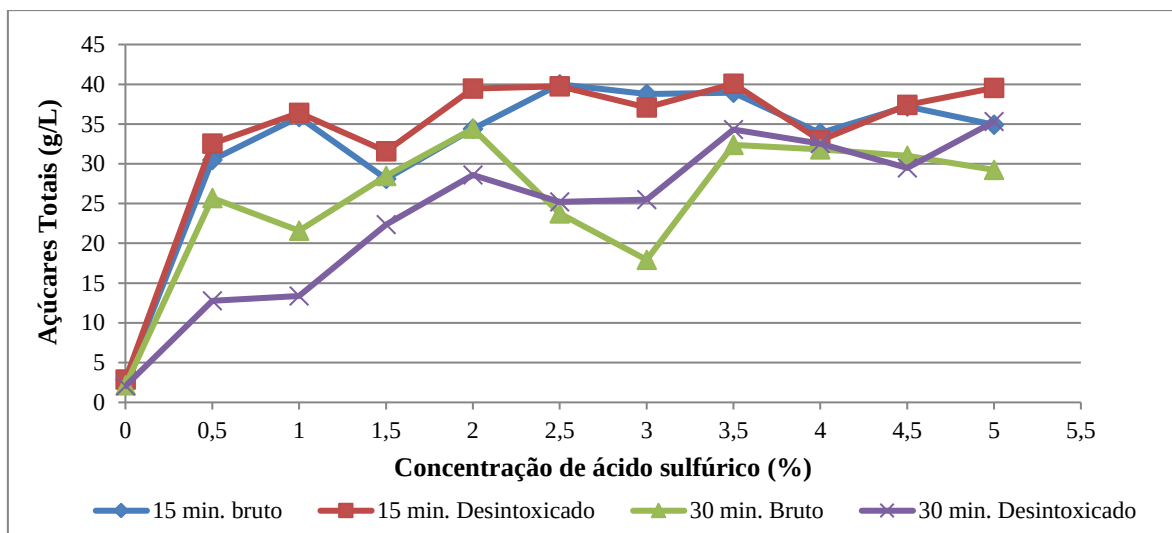
A análise dos resultados obtidos para os compostos fenólicos (CF) se encontra nas Tabelas 4 e 5. Observa-se que o tempo de aquecimento de 15 min. libera maiores teores de CF. Porém, após desintoxicação sua concentração nesse mesmo tempo de aquecimento de 15 min. diminuiu mais do que no tratamento de 30 min. (Figura 11). Nas concentrações que liberaram os maiores teores de açúcares, tanto totais quanto redutores, a concentração total de compostos fenólicos não apresentou diferença significativa entre os tempos de aquecimento. Para as concentrações 2,0 e 2,5% de ácido em 15 min. de aquecimento houve a liberação de 1,97 e 1,77 g de ác. vanílico/g, respectivamente. No processo de 30 min. de aquecimento esses valores foram de 1,83 e 1,05 g de ác. vanílico/g. Portanto, essa análise também indicou que o menor tempo de aquecimento foi o melhor para a hidrólise ácida.

Figura 11 – Teores de compostos Teores de compostos fenólicos obtidos na hidrólise ácida do sabugo de milho e aquecimento de 15 e 30 min. em autoclave ($121^\circ\text{C}/1.1 \text{ atm.}$).



Os resultados provenientes das análises de açúcares totais (AT) da biomassa hidrolisada de sabugo de milho durante o tempo de aquecimento em autoclave de 15 e 30 min. com e sem desintoxicação estão mostrados na Figura 12.

Figura 12 – Teores de açúcares totais obtidos na hidrólise ácida do sabugo de milho utilizando concentrações de 0,0 até 5,0% de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e tratamento térmico durante 15 e 30 min.

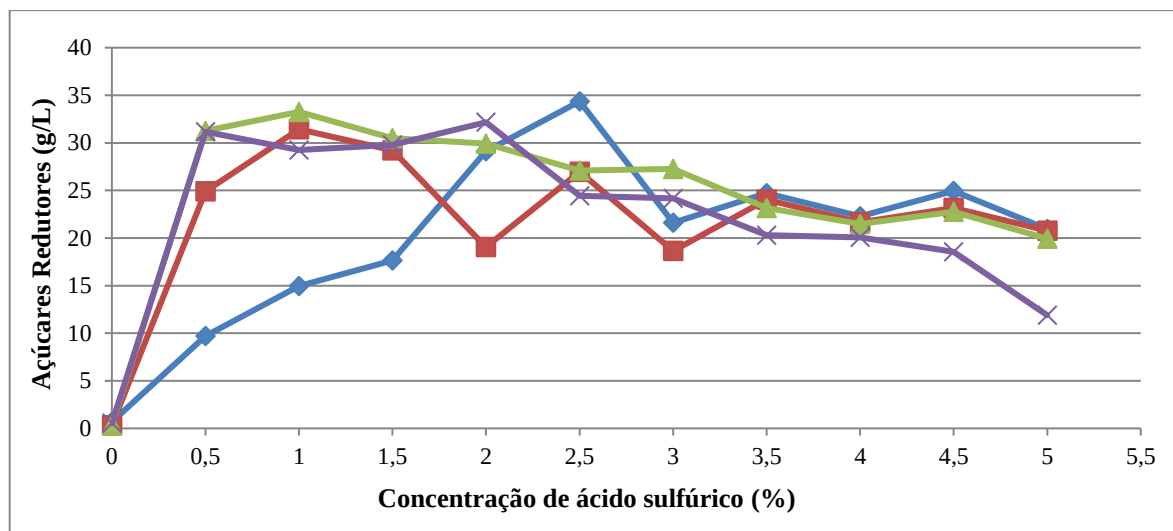


Por meio da Figura 12 é possível visualizar que os teores de AT foram mais elevados para o tempo de 15 min. de hidrólise e que houve uma relação direta com a concentração de H_2SO_4 e o tempo da reação em autoclave.

Para o tempo de aquecimento de 15 min. esse resultado do hidrolisado bruto ($35,57 \text{ g.L}^{-1}$) foi superior ao do trabalho anterior, onde foi obtido $22,67 \text{ g.L}^{-1}$. Sendo maior também para o hidrolisado desintoxicado (SILVA et al., 2020).

Na análise de açúcares redutores também é possível verificar pela Figura 13, que ao aumentar a concentração do ácido os teores de açúcar são menores, isso ocorre devido à capacidade do ácido de agir como catalisador, o que gera a protonação do átomo de oxigênio presente nas ligações glicosídicas durante o seu rompimento. A hidrólise dessas ligações leva a degradação dos polímeros diminuindo os teores de açúcares como glicose, xilose e arabinose (LOOW et al., 2016; ZHOU; LIU; ZHAO, 2021).

Figura 13 – Teores de açúcares redutores (AR) obtidos na hidrólise ácida do sabugo de milho e aquecimento de 15 e 30 min. em autoclave (121 °C/1.1 atm.).



Os pesquisadores El-Zawawy et al. (2011) utilizaram a concentração de 5,0% de H_2SO_4 em uma hidrólise ácida de sabugo de milho e tempo de aquecimento de 30 min., quantificaram apenas 4,5 g.L⁻¹ de açúcares totais, uma concentração bem menor do que a encontrada neste trabalho, que foi de 29,22 g.L⁻¹ de AT para 5,0% de ácido e tempo de aquecimento de 30 min.

A melhor concentração do ácido foi selecionada considerando que, apesar de, em uma concentração alta de ácido foram extraídos mais açúcares, na concentração menor foi obtido um teor satisfatório. Portanto, essa diferença induziu a escolha pelo processo que utilizou menos tempo de autoclave, bem como, menor concentração de reagente e uma liberação equivalente de açúcares.

Outra pesquisa realizada por Rocha et al. (2016) utilizou um pré-tratamento ácido do sabugo e da palha de milho. Nesta, testaram várias concentrações e tempos de aquecimento. Em seguida, realizaram uma hidrólise enzimática, obtendo maiores teores de AR quando utilizaram baixas concentrações de ácido. Com 0,5% de H_2SO_4 a 120°C por 15 min., para o sabugo de milho foram obtidos 42,6 g.L⁻¹ de AR e para a palha 50,9 g.L⁻¹. Esses resultados estão de acordo com a presente pesquisa (30,48 g.L⁻¹ para 0,5% de H_2SO_4), no entanto, a metodologia aqui utilizada não necessitou de hidrólise enzimática, o que torna o processo muito mais vantajoso e econômico.

Santos et al. (2017) submeteram resíduos de milho a um pré-tratamento hidrotérmico usando água a 170 °C/15 min e 195 °C/10 min, e agitação de 200 rpm para a palha e o sabugo do milho. Após isso, empregaram um extrato enzimático Accellerase®1500 (20 FPU/g_{biomassa}

seca) por 72 h agitando a 150 rpm, obtendo 7,4 g.L⁻¹ de AR para palha e 12,4 g.L⁻¹ de AR para o sabugo. Esses resultados foram menores aos encontrados neste trabalho, que na hidrólise ácida (2,5% de H₂SO₄/15 min. de aquecimento) foram obtido 39,99 g.L⁻¹ para o HB.

Os pesquisadores Ma et al. (2015) testaram um pré-tratamento com permanganato de potássio alcalino (APP) utilizando concentrações de 0,0 a 4,0% de KMnO₄, em diferentes tempos de processo (2, 4, 6 e 8 h) em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60 e 70 °C) e, após realizaram um tratamento enzimático. O maior teor de açúcares redutores foi 8,39 g.L⁻¹ com 2,0% da base durante 6 h a 50 °C, teor muito menor ao obtido na presente pesquisa (35,57 g.L⁻¹).

É importante ressaltar que nestas pesquisas apresentadas houve também a hidrólise enzimática e que, apesar disso, não houve um aumento da concentração dos açúcares obtidos, quando comparado à hidrólise realizada nesta pesquisa. Deste modo, a hidrólise ácida poderia tornar economicamente viável o processo fermentativo, uma vez que não há necessidade da adição de enzimas.

Os resultados obtidos em nosso estudo, em comparação com os relatados mostram que é possível trabalhar com a temperatura de 121 °C. Isto é importante, uma vez que, uma maior temperatura induz a maior desorganização na estrutura lignocelulósica usada como matéria-prima; tornando os açúcares fermentescíveis mais acessíveis, liberando maiores teores de ART após etapa de pré-tratamento e, ainda, utilizando concentrações de ácido sulfúrico menores.

No processo de hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos, além dos açúcares são formados compostos que podem ser inibidores da fermentação. Tais produtos derivam da degradação dos açúcares e da lignina. A sua toxicidade é um dos principais fatores que limitam a produção de etanol, sendo necessária à sua remoção. Para isto, são desenvolvidos métodos específicos de desintoxicação do material hidrolisado, para posterior processo de fermentação (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000; MUSSATTO; ROBERTO 2004).

Para o processo de desintoxicação ser considerado vantajoso, além de proporcionar uma remoção eficiente da quantidade de compostos inibidores, é importante que ele não cause grande redução na quantidade de açúcares presente no meio. Desta maneira, como observado na presente pesquisa, a quantidade de açúcares diminuiu muito pouco nos meios desintoxicados (Tabela 4 e 5). Portanto, o processo de desintoxicação pode ser considerado eficiente.

Na Figura 11, é possível visualizar que a liberação de compostos fenólicos determinados como ácido vanílico apresentou maior concentração nos ensaios conduzidos no tempo de aquecimento de 15 min., tanto para o hidrolisado bruto (HB) quanto para aquele submetido à desintoxicação físico-química (HD), variaram de 0,32 a 2,47 g de ác. vanílico/g

utilizando 0,0 e 3,0% de H_2SO_4 como agente químico de hidrólise, respectivamente. O menor teor de compostos fenólicos foi determinado quando utilizada a concentração de 1,0%, de ácido sulfúrico, 1,23 g de ác. vanílico/g.

Por outro lado, nos ensaios conduzidos com maior tempo de hidrólise, aquecimento de 30 min., foram verificados teores de compostos fenólicos inferiores aqueles descritos para 15 min. de processo, conforme é possível visualizar na Figura 13.

Além disso, a eficácia da desintoxicação também depende do tempo de contato do carvão ativado com o meio hidrolisado (MUSSATO; ROBERTO, 2004). O tempo de contato desta pesquisa foi de 60 min. e foi eficiente para os dois tempos de aquecimento da hidrólise, onde, a concentração dos CF com 2,5% de H_2SO_4 para o HB foi de 1,77 g de ácido vanílico/g após a desintoxicação diminuiu para 0,54 g de ácido vanílico/g e 1,05 g de ácido vanílico/g para 0,61 g de ácido vanílico/g para o HD durante 15 e 30 min., respectivamente, reduzindo a concentração dos compostos fenólicos em torno de 58,0% após a desintoxicação desses hidrolisados. Então, ao realizar a desintoxicação, algumas concentrações diminuíram ficando próximas as dos hidrolisados aquecidos durante 30 min., como o ocorrido para essa concentração que caiu para 0,54 g de ác. vanílico/g. Foi possível analisar com maior precisão esses resultados nas Tabelas 4 e 5.

Esse mesmo comportamento foi observado no trabalho anterior realizado por Silva et al. (2020) onde obtiveram maiores teores de CF na hidrólise com o tempo de aquecimento de 15 min. quando comparado com a hidrólise de 30 min. de aquecimento.

Portanto, é necessária uma otimização da desintoxicação, para que a concentração que liberou mais açúcares redutores (2,5% de H_2SO_4) garanta que a desintoxicação reduza apenas os CF que são inibidores da fermentação, sem a redução dos açúcares.

Assim, se tornando vantajosa a utilização de um processo de 15 min. ao invés da utilização de um aquecimento de 30 min., caso a desintoxicação apresente uma redução significativa nos teores de compostos fenólicos e não prejudique os teores de açúcares do hidrolisado.

O carvão ativado é um adsorvente amplamente pesquisado para a desintoxicação de hidrolisados lignocelulósicos que apresentam constituintes de maior hidrofobicidade como os compostos de furano e fenólicos. Lee e Park (2016) usaram carvão ativado em pó na desintoxicação de biomassa pré-tratada com ácido e a afinidade do carvão para diferentes componentes foi relatada na seguinte ordem: ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzóico, furfural, ácido acético, ácido sulfúrico e xilose (LEE; PARK, 2016). Os pesquisadores Monlau et al. (2015) utilizaram pirocarvão derivado de resíduos lignocelulósicos na desintoxicação de

hidrolisados de caules de milho e removeu com sucesso 100% do HMF e 91% do furfural sem afetar a concentração de açúcar.

Em um estudo realizado por Trinca et al. (2017) sobre a influência da presença de compostos fenólicos formados nos hidrolisados de casca de soja utilizados como substratos para produção de etanol, também observaram uma maior liberação de CF quando havia aquecimento das amostras, e que esta liberação destes compostos aumentava com o aumento da concentração de H_2SO_4 . Uma vez que, quando utilizaram concentrações de 3,5; 4,0 e 4,5% de H_2SO_4 verificaram a presença de até 0,6 mg/g de compostos fenólicos, enquanto que, em concentrações menores, como 2,0%, apenas encontraram 0,2 mg/g. Com aquecimento houve maior liberação de compostos fenólicos ao se utilizar 5,0% de H_2SO_4 durante 15 min. de aquecimento (1,97 g/g). Em nossa pesquisa foram encontrados 1,31 g de ác. vanílico/g para a concentração de 5,0%. No entanto, o aquecimento é necessário para aumentar a liberação de açúcares fermentescíveis e também para diminuir o tempo de hidrólise, mesmo ocorrendo à liberação de compostos fenólicos, que podem ser removidos por meio da desintoxicação.

Com base nos resultados obtidos, as melhores condições de hidrólise foram ácido sulfúrico 2.5% e tempo de aquecimento em autoclave de 15 min. para a realização do processo de hidrólise do sabugo de milho para produção de açúcares fermentescíveis a serem utilizados no processo fermentativo para produção de etanol 2G.

5.1.2 Folhas de Sisal

A planta de sisal possui altos teores de celulose e hemicelulose, o que a torna um substrato com potencial para a produção de bioetanol. É composta por 50,83% de holocelulose, 22,91% de hemicelulose, 28,72% de alfacelulose e 17,9% de lignina. O teor de holocelulose representa a quantidade de açúcares totais encontrados no material lignocelulósico (MEDEIROS et al. 2020).

A Tabela 6 mostra a análise estatística dos resultados obtidos da hidrólise ácida com aquecimento durante 15 min. Nesta pode ser observado que a maior concentração de AT foi de 15,50 g.L⁻¹ utilizando 4,0% de H_2SO_4 . Após a desintoxicação houve pouca redução nos teores dos açúcares.

Tabela 6 – Resultados estatísticos das diferentes hidrólises realizadas nos HB e HD de sisal, nas concentrações de ácido sulfúrico utilizadas para o tempo de 15 min. de aquecimento em autoclave (121 °C).

[H ₂ SO ₄]	Açúcares totais (g.L ⁻¹)		Açúcares redutores (g.L ⁻¹)		Compostos Fenólicos (g ác. vanílico/g)	
	Bruto	Desintoxicado	Bruto	Desintoxicado	Bruto	Desintoxicado
0,0	5,58±0,55 ^e	4,71±0,29 ^e	2,14±0,02 ^e	1,46±0,06 ^e	0,98±0,04 ^{bc}	0,76±0,02 ^{bc}
0,5	8,11±0,85 ^{cd}	6,80±0,23 ^{de}	2,74±0,06 ^{de}	2,39±0,30 ^{de}	1,01±0,00 ^{bc}	0,75±0,00 ^{bc}
1,0	8,45±1,71 ^d	7,27±1,50 ^d	3,99±0,49 ^{cd}	3,27±0,39 ^d	0,93±0,39 ^{bc}	0,64±0,14 ^c
1,5	9,20±0,18 ^{cd}	8,48±0,39 ^{cd}	5,59±0,60 ^{bc}	6,32±0,19 ^c	1,39±0,10 ^{ab}	0,87±0,00 ^{ab}
2,0	6,44±0,44 ^{de}	6,71±0,32 ^{de}	4,01±0,31 ^{cd}	6,15±0,17 ^c	0,65±0,02 ^c	0,36±0,02 ^d
2,5	12,90±0,42 ^b	12,09±0,19 ^{ab}	9,04±0,51 ^a	9,95±0,93 ^b	1,65±0,28 ^a	0,83±0,02 ^{ab}
3,0	8,33±0,10 ^d	7,16±0,23 ^d	5,66±0,44 ^{bc}	7,47±0,70 ^c	0,68±0,03 ^c	0,40±0,01 ^d
3,5	13,65±0,66 ^{bc}	12,42±0,70 ^a	9,43±0,05 ^a	12,58±0,10 ^a	1,57±0,02 ^a	0,95±0,05 ^a
4,0	15,50±1,38 ^a	11,90±0,69 ^{ab}	4,51±0,55 ^{bc}	12,07±0,48 ^a	1,53±0,14 ^a	0,90±0,03 ^{ab}
4,5	14,76±0,07 ^{ab}	12,13±0,30 ^a	6,11±0,66 ^b	12,27±0,37 ^a	1,42±0,05 ^{ab}	0,77±0,06 ^{bc}
5,0	13,80±0,46 ^{ab}	9,96±1,47 ^{bc}	5,66±0,28 ^{bc}	10,02±0,80 ^b	1,50±0,10 ^a	0,78±0,06 ^{abc}
Erro Padrão	0,61	0,48	0,40	0,69	0,07	0,033
P – Valor	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

^{a-b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre si ($P < 0,05$);

Nessa Tabela 6 pode-se observar que a concentração do ácido 2,5% promoveu a formação de 9,04 g.L⁻¹ de AR não havendo diferença significativa com a concentração de 3,5% (9,43 g.L⁻¹), portanto, a menor concentração de ácido foi selecionada.

Na Tabela 7 é possível verificar os resultados da hidrólise com aquecimento de 30 min. em autoclave (121 °C/1.1 atm.). Os maiores teores de AR foram obtidos a partir concentração de 3,5% de H₂SO₄ até a concentração final de 5,0%. Também se observa que os resultados obtidos não tiveram diferença significativa.

Tabela 7 – Resultados estatísticos das diferentes análises realizadas nos HB e HD do sisal, nas concentrações de ácido sulfúrico utilizadas para o tempo de 30 min. de aquecimento em autoclave (121 °C).

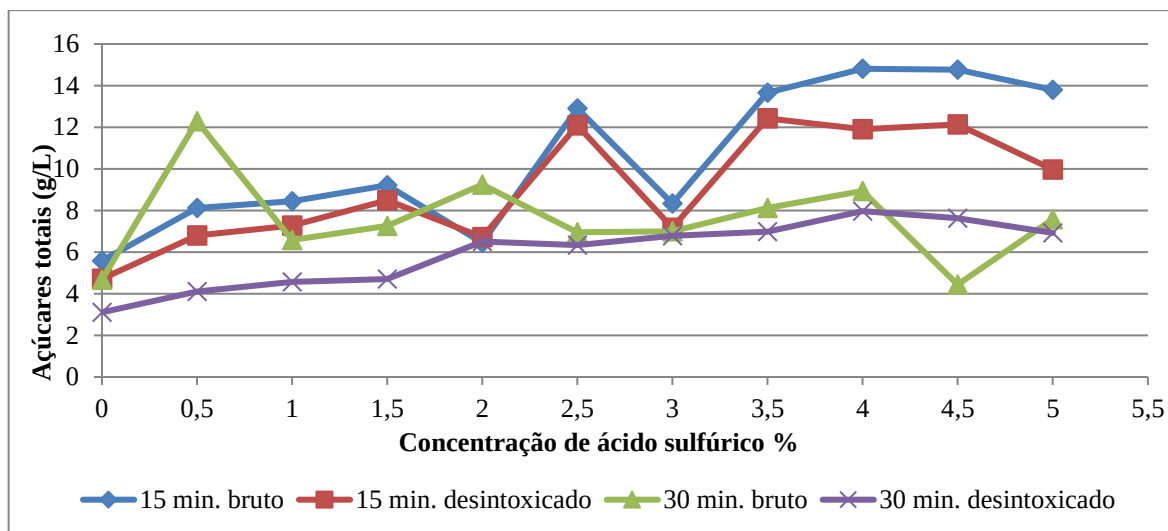
[H ₂ SO ₄]	Açúcares totais (g.L ⁻¹)		Açúcares redutores (g.L ⁻¹)		Compostos Fenólicos (g ác. vanílico/g)	
	Bruto	Desintoxicado	Bruto	Desintoxicado	Bruto	Desintoxicado
0,0	4,68±0,47 ^e	3,10±0,10 ^d	0,97±0,04 ^d	2,58±0,23 ^d	0,58±0,01 ^e	0,58±0,10 ^{cd}
0,5	12,29±0,50 ^a	4,11±0,21 ^{cd}	4,11±0,31 ^c	4,37±0,10 ^{cd}	0,96±0,03 ^d	0,51±0,01 ^{de}
1,0	11,07±0,96 ^a	4,57±0,21 ^c	4,83±0,26 ^{bc}	5,73±0,15 ^{bc}	1,12±0,06 ^{ab}	0,74±0,03 ^b
1,5	7,26±0,10 ^{cd}	4,70±0,48 ^c	5,35±0,23 ^{bc}	6,26±0,13 ^{ac}	1,13±0,05 ^{ab}	0,88±0,01 ^a
2,0	9,24±0,10 ^b	6,51±0,33 ^b	6,26±0,53 ^{ab}	8,12±0,10 ^a	1,01±0,06 ^{bd}	0,43±0,06 ^{ef}
2,5	6,95±0,49 ^d	6,34±0,26 ^b	6,35±0,33 ^{ab}	4,42±1,01 ^{cd}	1,17±0,04 ^a	0,64±0,00 ^{bc}
3,0	6,99±1,12 ^{cd}	6,77±1,06 ^{ab}	5,92±0,90 ^{ab}	4,27±0,54 ^d	1,02±0,03 ^{bd}	0,49±0,01 ^{de}
3,5	8,11±0,45 ^{bcd}	6,98±0,35 ^{ab}	7,33±0,19 ^a	5,39±0,91 ^{bc}	1,00±0,03 ^{bd}	0,55±0,00 ^{cd}
4,0	8,93±0,10 ^{bc}	7,96±0,46 ^a	7,28±0,86 ^a	6,94±1,44 ^{ab}	1,01±0,06 ^{bd}	0,42±0,02 ^{ef}
4,5	4,44±0,31 ^e	7,63±0,38 ^{ab}	7,36±0,91 ^a	6,74±0,71 ^{ab}	1,00±0,01 ^{bd}	0,35±0,01 ^f
5,0	7,58±0,47 ^{cd}	6,91±0,28 ^{ab}	7,02±0,54 ^a	7,28±0,30 ^{ab}	1,01±0,00 ^{bd}	0,42±0,01 ^{ef}
Erro Padrão	0,40	0,28	0,33	0,30	0,03	0,027
P – Valor	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

^{a-b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre si ($P < 0,05$);

Para uma melhor visualização, nas Figuras 14, 15 e 16 estão apresentados os resultados provenientes das análises da biomassa hidrolisada bruta e com desintoxicação.

Para os açúcares redutores liberados durante as condições de hidrólise testadas, foi verificado comportamento semelhante ao demonstrado para açúcares totais, que também podem ser observados visualmente nas Figuras 14 e 15.

Figura 14 – Teores de açúcares totais (AT) obtidos na hidrólise ácida de sisal utilizando diferentes concentrações de H_2SO_4 e tempos de aquecimento em autoclave (121 °C).



Na Figura 15 é visto que os teores de AR para os HD aumentam a partir da concentração de 3,5% de H_2SO_4 , no entanto, esses valores podem não ser apenas monossacarídeos redutores e sim outros compostos presentes detectados no mesmo comprimento de onda. Para uma análise mais específica seria necessária como, por exemplo, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Figure 15 – Teores de açúcares redutores (AR) obtidos na hidrólise ácida do sisal utilizando diferentes concentrações de H_2SO_4 e tempos de aquecimento em autoclave (121 °C).

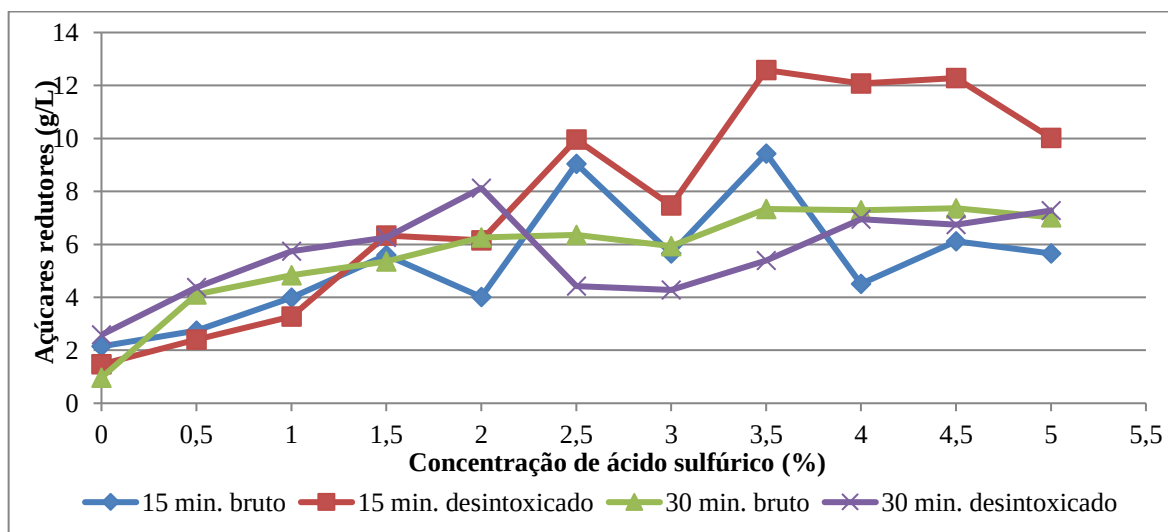
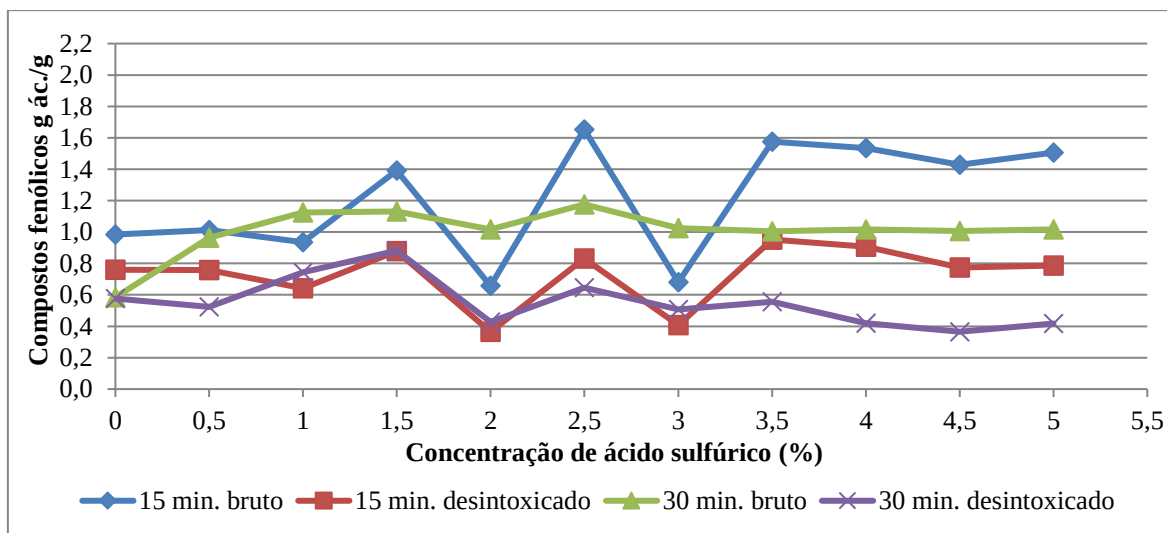


Figura 16 – Teores de compostos fenólicos obtidos nos HB e HD de sisal nas concentrações de ácido sulfúrico utilizadas para o tempo de 15 e 30 min. de aquecimento em autoclave.



Bezerra et al. (2016) realizaram a hidrólise ácida de bagaço de sisal testando diferentes concentrações de H_2SO_4 (0,5; 1,5 e 2,5%) submetidas a 1 hora de tratamento em diferentes temperaturas (100; 110 e 120 °C). Eles analisaram os açúcares fermentescíveis obtidos por CLAE, quantificando 6,2 g.L^{-1} de xilose e 3,66 g.L^{-1} de glicose e, indicaram que o melhor resultado obtido foi com 2,5% do ácido a 120 °C. Essas condições são semelhantes às utilizadas na presente pesquisa, que, no entanto, utilizou apenas 15 min. de aquecimento.

Kaschuk et al. (2017) hidrolisou enzimaticamente a polpa de sisal, já pré-tratada com NaOH, e constatou por CLAE, que em 15 h de processo grande parte da celulose havia sido hidrolisada obtendo 18,7 g.L^{-1} de AR em 40 h de hidrólise. A metodologia usada na presente pesquisa utilizou tempos de aquecimento e procedimento menos drásticos, como 15 e 30 min. e sem utilizar enzimas, obtendo 9,04 g.L^{-1} . Isto, a pesar de ser uma concentração menor, promoveria um processo mais econômico para fermentação do sisal hidrolisado.

Nos materiais lignocelulósicos a maior parte da celulose é cristalina, portanto, são necessárias altas temperaturas e altas concentrações de ácido para liberar glicose destas cadeias que estão fortemente agregadas e protegidas por cadeias de hemicelulose e lignina. Além disso, o rendimento aumenta com o aumento da temperatura. Estes altos rendimentos são importantes para obter baixos custos e têm motivado o uso de ácido sulfúrico diluído na hidrólise ácida. Pois, o uso de ácido sulfúrico apresenta menor custo quando comparado com o uso de enzimas que degradam a celulose.

Assim como para os hidrolisados do sabugo de milho, os hidrolisados do sisal apresentaram maior teor de compostos fenólicos durante o aquecimento de 15 min. e quanto

maior a temperatura e tempo de reação maior foi a exposição e a liberação desses compostos. Porém, após a desintoxicação esses teores foram diminuídos e algumas concentrações não apresentaram diferença significativa entre elas. Favorecendo o tempo de aquecimento de 15 min. na produção de açúcares fermentescíveis.

A partir destes resultados, os parâmetros selecionados para os hidrolisados do sisal foram de 2,5% de H_2SO_4 e aquecimento em autoclave a 121 °C durante 15 min.

5.1.3 Resíduos de mandioca

Os resíduos de mandioca foram submetidos ao processo de hidrólise durante 10 e 15 min. de aquecimento em autoclave (121 °C/1.1 atm.). O tempo de aquecimento de 30 min. não foi realizado, uma vez que, nos processos de hidrólise de sabugo de milho e sisal, este tempo mostrou resultados similares ao de 15 min. Entretanto as concentrações de H_2SO_4 testadas foram iguais às usadas nesses resíduos.

A Tabela 8 mostra que o maior teor de AT foi obtido em 10 min. de aquecimento de 69,12 g.L⁻¹ com 1,0% de H_2SO_4 . Para esse processo de 10 min. de aquecimento não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as concentrações testadas de 0,5 até 4,5%. Este mesmo comportamento foi observado nos resultados na determinação dos AT dos hidrolisados desintoxicados, onde também não houve diferença significativa.

O maior valor para AR foi 52,29 g.L⁻¹ obtido no processo que utilizou a concentração de 1,5% de ácido sulfúrico; após a desintoxicação este valor diminuiu para 48,09 g.L⁻¹ (Tabela 8).

Os resultados das análises realizadas para os hidrolisados de mandioca aquecidos durante 15 min. em autoclave (121 °C/1.1 atm.) estão apresentados na Tabela 9. Nesta, pode-se observar que, o maior valor obtido para AT foi de 66,91 g.L⁻¹ em 15 min. de aquecimento e 2,0% de ácido. Destes, 57,30 g.L⁻¹ foram determinados como AR, sendo também a maior concentração obtida. A análise estatística dos resultados da determinação de açúcares nos tempos de 10 e 15 min. de aquecimento não apresentou diferença significativa em 2,0%. Pois, foi obtido um valor de $P=0,22$ e $P > 0,05$ entre esses tempos testados.

Tabela 8 – Resultados estatísticos das diferentes análises realizadas nos HB e HD dos resíduos de mandioca nas concentrações de ácido sulfúrico utilizadas para o tempo de 10 min. de aquecimento em autoclave (121 °C).

[H ₂ SO ₄] (%)	Açúcares totais (g.L ⁻¹)		Açúcares redutores (g.L ⁻¹)		Compostos Fenólicos (g ác. vanílico/g)	
	Bruto	Desintoxicado	Bruto	Desintoxicado	Bruto	Desintoxicado
0,0	4,56±2,81 ^c	2,98±2,01 ^b	3,12±1,84 ^c	2,45±1,20 ^c	0,07±0,06 ^e	0,00±1,81 ^b
0,5	60,31±1,42 ^a	61,20±1,35 ^a	40,73±2,33 ^b	38,52±2,45 ^b	0,29±0,02 ^d	0,16±0,02 ^a
1,0	69,12±1,99 ^a	56,11±1,74 ^a	43,55±1,50 ^{ab}	35,30±2,94 ^b	0,30±0,04 ^c	0,20±0,05 ^a
1,5	63,31±1,86 ^a	64,00±1,51 ^a	52,29±0,59 ^a	48,09±0,09 ^a	0,32±0,06 ^c	0,12±0,04 ^a
2,0	64,39±5,94 ^a	62,95±5,05 ^a	50,59±0,72 ^a	47,67±1,57 ^a	0,32±0,04 ^c	0,12±0,06 ^a
2,5	66,16±1,41 ^a	53,40±1,97 ^a	42,42±1,98 ^{ab}	34,78±1,81 ^b	0,31±0,00 ^a	0,08±0,04 ^a
3,0	61,56±0,14 ^a	60,22±1,01 ^a	47,58±0,39 ^{ab}	47,58±3,93 ^a	0,34±0,05 ^a	0,07±0,06 ^a
3,5	67,94±0,58 ^a	49,83±0,29 ^a	46,51±0,85 ^{ab}	46,93±1,31 ^a	0,37±0,02 ^b	0,09±0,09 ^a
4,0	61,10±3,27 ^a	54,13±0,75 ^a	40,21±4,12 ^b	35,90±2,48 ^b	0,38±0,01 ^a	0,10±0,01 ^a
4,5	59,28±1,74 ^a	51,81±1,42 ^a	40,22±1,63 ^b	38,05±1,15 ^b	0,43±0,06 ^{ab}	0,10±0,04 ^a
5,0	51,12±1,93 ^b	49,68±1,95 ^a	41,05±0,99 ^b	44,92±1,71 ^{ab}	0,43±0,00 ^{ab}	0,10±0,04 ^a
Erro Padrão	1,50	1,71	1,28	2,02	0,17	0,04
P – Valor	0,35	0,05	0,02	0,00	0,00	0,46

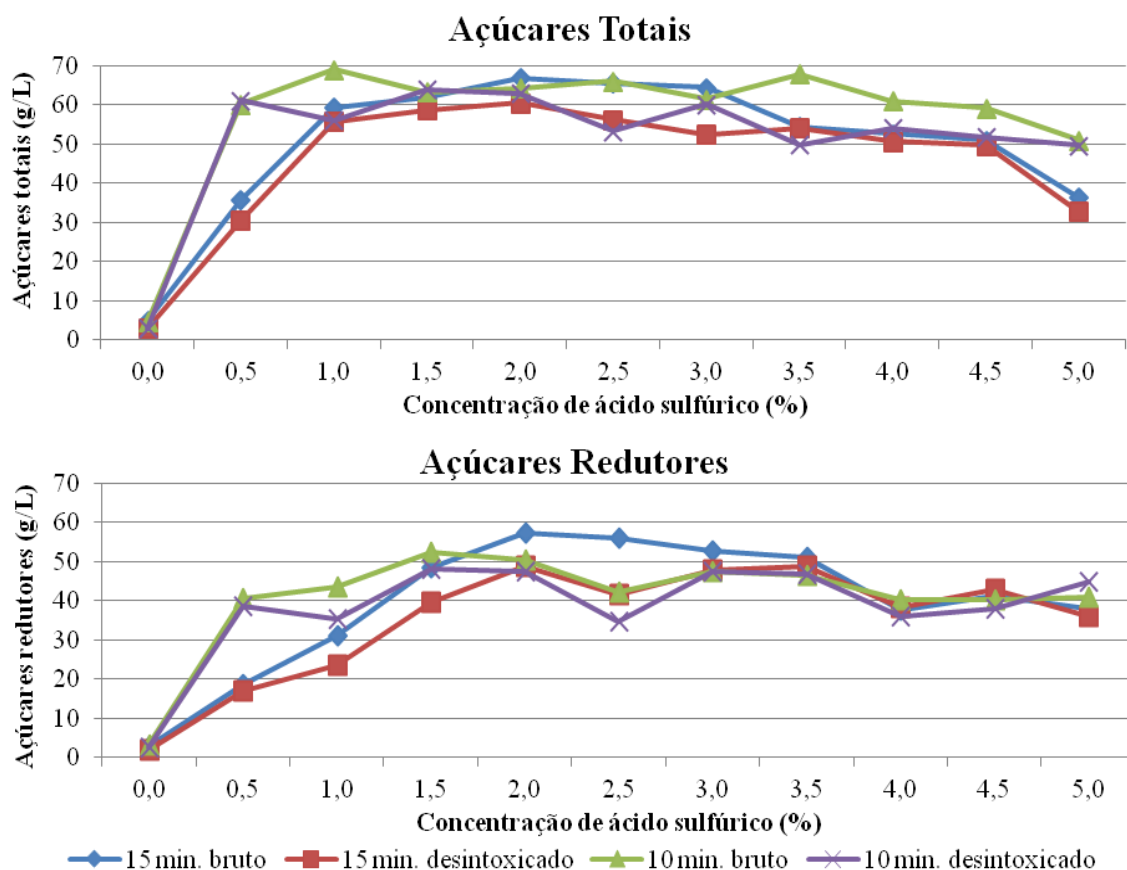
^{a-b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre si ($P < 0,05$);

Tabela 9 – Análise estatística das diferentes análises realizadas nos HB e HD dos resíduos de mandioca nas concentrações de ácido sulfúrico testadas para o tempo de 15 min. de aquecimento em autoclave (121 °C).

[H ₂ SO ₄]	Açúcares totais (g.L ⁻¹)		Açúcares redutores (g.L ⁻¹)		Compostos Fenólicos (g ác. vanílico/g)	
	Bruto	Desintoxicado	Bruto	Desintoxicado	Bruto	Desintoxicado
0,0	4,89±2,47 ^f	3,012±1,60 ^d	2,987±4,51 ^e	2,054±1,11 ^e	0,09±0,14 ^d	0,01±0,04 ^d
0,5	35,79±0,12 ^c	30,54±0,18 ^{bc}	18,54±2,91 ^d	16,98±1,94 ^d	0,19±0,54 ^c	0,01±0,05 ^d
1,0	59,45±0,94 ^{bc}	55,75±0,36 ^{ab}	31,09±4,12 ^c	23,58±2,09 ^d	0,22±0,01 ^{bc}	0,09±0,00 ^{bc}
1,5	61,90±3,51 ^b	58,82±3,65 ^{ab}	48,54±1,78 ^{ab}	39,54±1,58 ^{bc}	0,19±0,94 ^c	0,08±0,00 ^c
2,0	66,91±1,30 ^a	60,53±0,50 ^a	57,30±0,81 ^a	48,83±0,19 ^a	0,26±0,02 ^{bc}	0,08±0,00 ^c
2,5	65,61±1,99 ^a	56,25±0,65 ^b	55,98±1,25 ^a	41,50±2,12 ^{abc}	0,27±0,00 ^{bc}	0,09±0,00 ^{bc}
3,0	64,50±1,16 ^{ab}	54,50±1,86 ^b	52,92±2,28 ^{ab}	47,81±3,66 ^a	0,32±0,03 ^{ab}	0,11±0,00 ^a
3,5	54,46±2,40 ^{cd}	52,20±0,56 ^b	51,19±2,87 ^{ab}	48,75±2,87 ^a	0,35±0,00 ^{ab}	0,11±0,06 ^{ab}
4,0	52,76±1,69 ^d	50,65±1,13 ^c	37,57±2,59 ^{bc}	38,36±3,80 ^{bc}	0,40±0,01 ^a	0,09±0,03 ^{bc}
4,5	51,12±2,10 ^d	49,68±0,87 ^c	41,15±1,12 ^{bc}	42,90±2,59 ^{ab}	0,34±0,04 ^{ab}	0,07±0,00 ^c
5,0	36,54±0,70 ^e	32,80±1,49 ^{bc}	38,03±0,29 ^{bc}	36,14±0,78 ^c	0,30±0,00 ^{bc}	0,09±0,02 ^{bc}
Erro Padrão	3,39	2,68	3,08	2,80	0,01	0,00
P – Valor	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

^{a-b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre si ($P < 0,05$);

Figura 17 – Concentrações de açúcares totais (AT) e açúcares redutores (AR) liberados durante a hidrólise ácida dos resíduos de mandioca, nos HB e HD, a partir de diferentes concentrações de H_2SO_4 e tempos de aquecimento de 15 e 10 min. em autoclave.



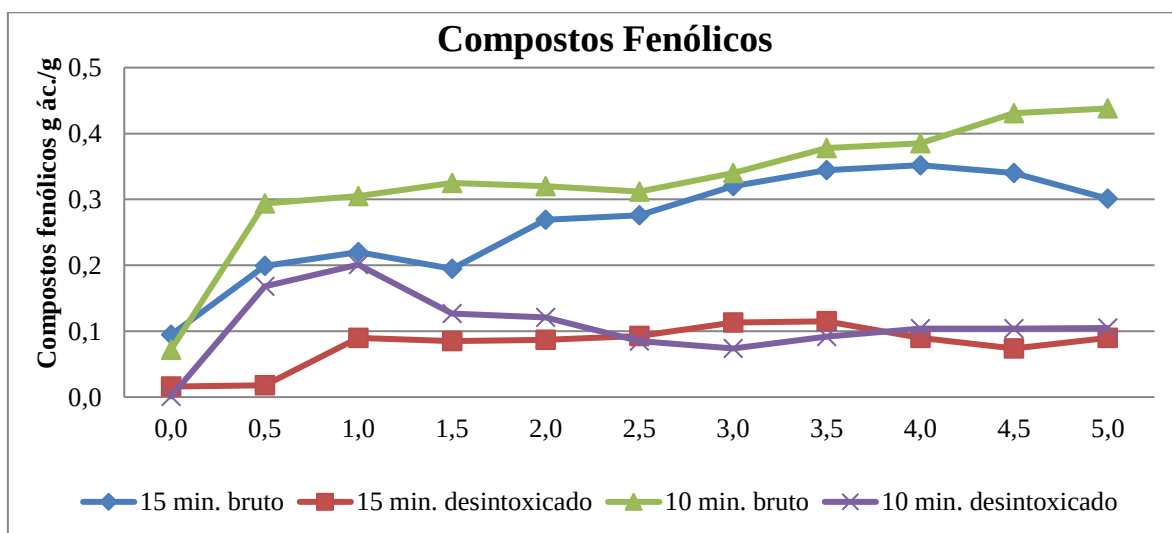
A Figura 17 mostra a formação de açúcares da hidrólise ácida dos resíduos de mandioca. Nesta, os melhores resultados foram obtidos na concentração de 2,0% de H_2SO_4 , embora, para o HB tenha sido 1,5% em 10 min. Porém a análise estatística dessa concentração no tempo de 15 min. não mostrou diferenças significativas. Portanto, é possível padronizar os processos de hidrólise realizados com os materiais já estudados (sabugo de milho e sisal) e, dessa maneira poder fazer a comparação entre eles, foi selecionado o tempo de 15 min. para a hidrólise ácida.

Embora outros pesquisadores também tenham utilizado ácido sulfúrico diluído para hidrolisar resíduos de mandioca, como por exemplo, Loureiro et al. (2020), com o uso da concentração de 5% de H_2SO_4 e um tempo de aquecimento maior, 2 horas a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$; obtendo $44,68\text{ g.L}^{-1}$ de AR. Nessa mesma concentração, em nossa pesquisa, foram obtidos $40,21\text{ g.L}^{-1}$ de AR, porém, com aquecimento de apenas 10 min. em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. E $38,03\text{ g.L}^{-1}$ com

apenas 15 min. de aquecimento. Este menor tempo de aquecimento permite um processo mais rápido e mais barato e, além disso, evita a formação de CF.

Os valores obtidos dos teores de CF (Tabelas 8 e 9) mostram que o processo de desintoxicação foi eficiente, acarretou a uma redução de aproximadamente 75 e 90% nos níveis dos CF presentes nos meios hidrolisados desintoxicados que foram utilizados para fermentação. Na Figura 18 observa-se que a maior liberação desses compostos ocorreu a partir da concentração de 3,0% de H_2SO_4 durante 10 e 15 min. de aquecimento, e o maior valor obtido foi em 10 min. de aquecimento na concentração de 5,0% (0,43 g ác. vanílico/g). Com maiores teores liberados nas maiores concentrações.

Figura 18 – Teores de compostos fenólicos obtidos nos HB e HD dos resíduos de mandioca nas concentrações de ácido sulfúrico utilizadas para o tempo de 10 e 15 min. de aquecimento em autoclave.



Esses resultados não apresentaram muita diferença entre os CF dos hidrolisados brutos antes do tratamento. Portanto, e assim como observado para os outros resíduos lignocelulósicos hidrolisados nesta pesquisa (sabugo de milho e sisal), foi fixado o tempo de 15 min. para padronização de todas as hidrólises ácidas a que foram submetidos estes resíduos.

Após a análise dos resultados encontrados de AR e também a avaliação das concentrações de CF liberados no meio hidrolisado foi possível identificar que 2,0% de H_2SO_4 por 15 min. de aquecimento apresentaram os melhores resultados (66,91 g.L⁻¹ de açúcares totais, 57,30 g.L⁻¹ de açúcares redutores e 0,26 g ác. vanílico.g⁻¹, diminuindo para 0,08 após a desintoxicação). Esses parâmetros foram escolhidos como os melhores para realizar a fermentação com os meios HB e HD.

O comportamento desses resultados de AT, AR e CF segue o mesmo padrão que os teores obtidos para os hidrolisados de sabugo de milho e folhas de sisal. Essa avaliação das diferentes concentrações do ácido e dos diferentes tempos de aquecimento em autoclave indicou que ao aumentar a concentração acima de 3,0%, o fracionamento do material lignocelulósico para conversão em açúcares é prejudicada. Além desse aumento da concentração, ao aumentar o tempo de contato da biomassa com o ácido também há influência na liberação dos açúcares, pois, ocorre a formação de outros compostos de degradação a partir da hemicelulose e da lignina. Estes foram detectados nas hidrolises que sofreram aquecimento durante 30 min. Com o intuito de avaliar e identificar estes compostos liberados foram realizadas análises em CLAE (em inglês HPLC – High Performance Liquid Chromatography).

5.2 5.2 ANÁLISES DE COMPOSTOS INIBITÓRIOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE/HPLC).

A análise por CLAE foi realizada nos hidrolisados selecionados, com 2,0% de ácido sulfúrico para os resíduos de mandioca e 2,5 % para o sabugo de milho e sisal e tempo de aquecimento em autoclave de 15 min. (121 °C/1.1 atm.). A finalidade foi identificar alguns compostos inibidores que poderiam estar presentes nos meios hidrolisados.

Segundo a literatura os principais compostos derivados do tratamento ácido e aquecimento da hemicelulose e da celulose são subprodutos, como, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e furanos. Dentre os ácidos, o mais frequente é o ácido acético, derivado da desacetilação da hemicelulose, ácido fórmico e ácido levulínico. Os derivados de furano são o furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) formados pela desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente. E por último, a quebra da lignina gera compostos fenólicos como, por exemplo, seringaldeído, ácido 4-hidroxibenzaldeído e 4-hidroxibenzóico e os ácidos: salicílico, vanílico, siríngico, gentísico, entre outros (TAHERZADEH et al., 2000; JONSSON et al., 2013).

Antes da análise por HPLC dos meios hidrolisados foram determinados os tempos de retenção de alguns dos compostos encontrados durante a hidrólise ácida com aquecimento de materiais lignocelulósicos, que serão utilizados como padrão de comparação. A Tabela 10 mostra esses compostos e seus respectivos tempos de retenção.

Tabela 10 – Compostos utilizados como padrão na análise dos meios hidrolisados e seus respectivos tempos de retenção obtidos por HPLC.

Composto inibidor	Tempo de retenção (min.)
Hidroximetilfurfural	7,86
Furfural	10,71
Ácido Siringico	14,67
Siringaldeído	15,63
Ácido p-cumarico	16,11
Ácido Ferúlico	16,60

A partir dos tempos de retenção (Tabela 10) as amostras dos hidrolisados bruto e desintoxicado foram analisadas quanto à presença destes compostos, e seus resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Compostos obtidos na análise por HPLC dos meios hidrolisados bruto e desintoxicado.

Amostras	Processo	Furfural	Ácido p-cumárico	Ácido ferúlico	Siringaldeído	Ácido siringico	HMF
Sabugo	Bruto	X	X	X			
Sabugo	Desintoxicado	X	X	X			
Sisal	Bruto	X	X			X	
Sisal	Desintoxicado	X			X		
Mandioca	Bruto	X			X		X
Mandioca	Desintoxicado	X					X

HMF: Hidroximetilfurfural.

O furfural, derivado da xilose está presente em todos os meios hidrolisados, inclusive nos meios desintoxicados, porém, os compostos que ainda foram identificados após a desintoxicação provavelmente se encontraram em menor quantidade. O que foi possível visualizar pela diferença da área encontrada no pico de furfural que foram menores para os meios desintoxicados, inclusive houve diminuição no tempo de retenção, o que também indica a menor concentração do composto (Figura 19).

Após a desintoxicação o meio hidrolisado do sabugo continuou a apresentar furfural, ácido p-cumárico e ácido ferúlico, porém, não foi possível quantificá-los, ainda assim, pelo cromatograma é bem visível a diminuição da área dos picos destes compostos.

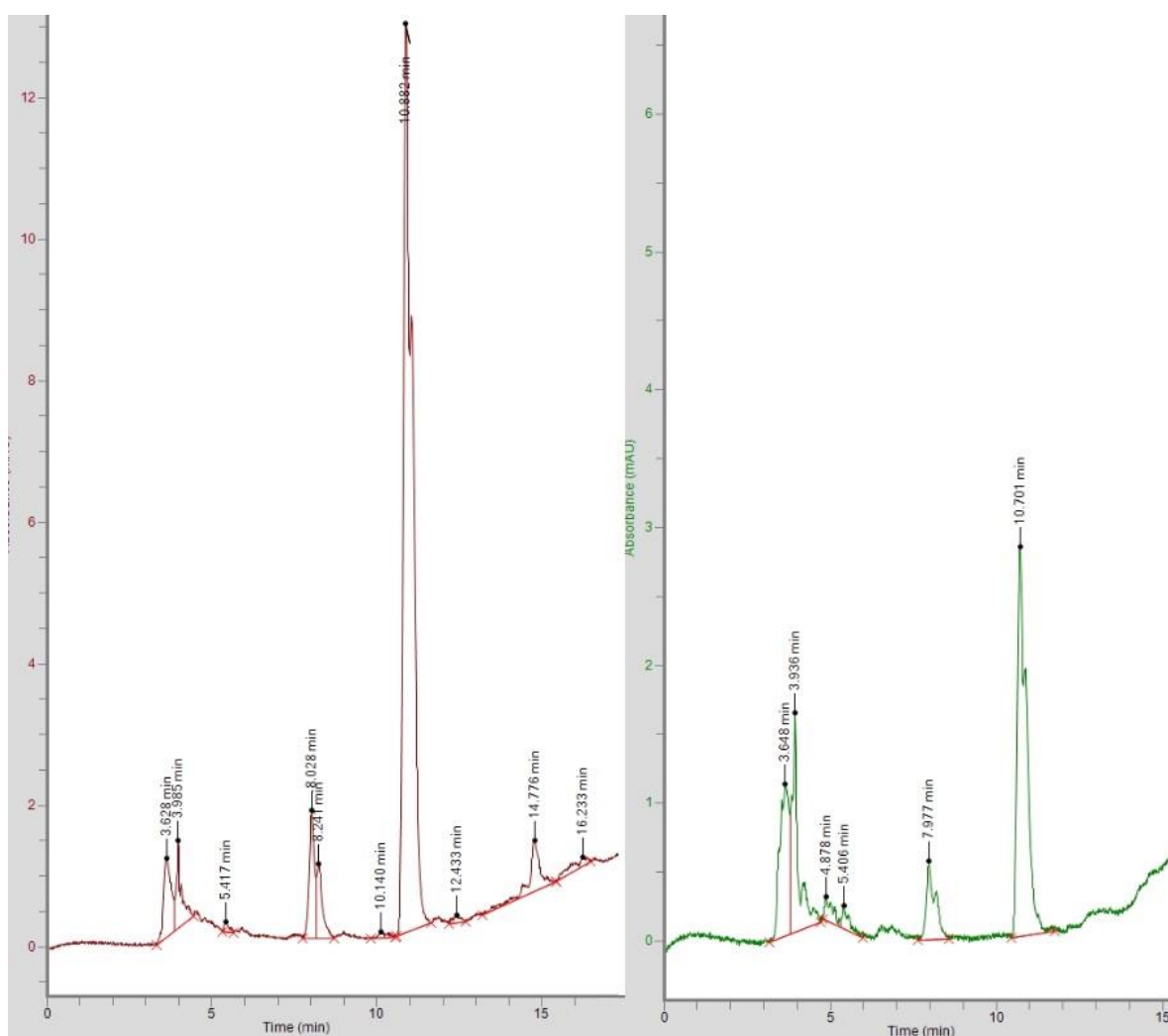
Os ácidos p-cumárico presentes nos hidrolisados de sabugo de milho e sisal, assim como o ácido ferúlico presente no meio do sabugo são os compostos fenólicos mais abundantes

nos resíduos lignocelulósicos, pois, constituem a parede celular das plantas, onde, estes estão associados aos componentes da parede celular de forma livre ou ligados covalentemente através de ligações éster ou éter a lignina e a hemicelulose, fazendo a conectividade com a parede celular da planta (DAMASCENO et al., 2010).

O siringaldeído foi identificado no meio hidrolisado de sisal desintoxicado, este, é um derivado do ácido sirínico que estava presente no meio de sisal antes da desintoxicação.

Nos meios hidrolisados dos resíduos de mandioca houve a identificação de HMF e furufural, além do siringaldeído no meio bruto. O HMF é derivado da glicose e o meio hidrolisado de mandioca foi o que apresentou a maior concentração de açúcares redutores, os resultados da análise de compostos fenólicos indicam que a glicose foi transformada em HMF durante a hidrólise ácida.

Figura 19 – Cromatograma do composto furfural antes e após a desintoxicação do hidrolisado de sabugo de milho (sinal pelo tempo de retenção).



Para uma análise quantitativa destes compostos no meio hidrolisado é necessária uma metodologia de análise mais específica. A metodologia empregada nesta pesquisa apenas conseguiu identificar a presença dos compostos pela comparação com os respectivos padrões, desta forma a metodologia empregada foi adequada.

Para a identificação de outros compostos, além dos analisados na presente pesquisa, é preciso de novos padrões para comparação.

5.3 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO COM O USO DE MEIO SINTÉTICO

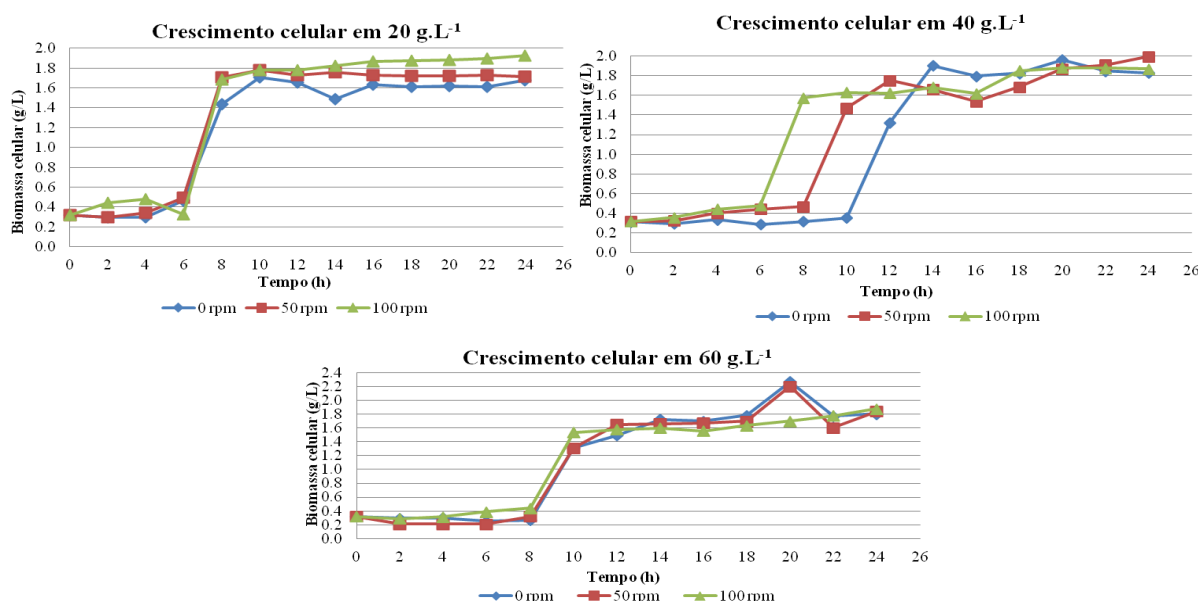
5.3.1 Avaliação dos parâmetros: tempo de incubação, agitação e pH inicial do meio

As fermentações foram realizadas utilizando um meio sintético padrão adicionado de glicose ou xilose, como fontes de carbono, nas concentrações iniciais 20,0; 40,0 e 60,0 g.L⁻¹ desses açúcares. Foram avaliados o desenvolvimento celular e a produção de etanol das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* para selecionar os melhores parâmetros e condições de fermentação e, posteriormente, substituir essas fontes de carbono por concentrações equivalentes dos meios hidrolisados obtidos de sabugo de milho, sisal e resíduos de mandioca. As fermentações foram realizadas utilizando as diferentes concentrações de glicose ou xilose, submetidas a diferentes pH iniciais (5,5; 6,0 e 6,5), agitação (0; 50 e 100 rpm) na temperatura de 30 °C durante 24 h de incubação. Foram realizadas 10 combinações com uma repetição no ponto central, em triplicata, para cada meio sintético.

5.3.1.1 Estudo do comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético adicionado de diferentes concentrações de glicose

O desenvolvimento da levedura foi determinado por análises realizadas a cada 2 h durante uma fermentação de 24 h a 30 °C. Na Figura 19 estão representadas as médias da produção de biomassa celular obtidas durante o experimento para cada uma das concentrações iniciais de glicose (20, 40 e 60 g.L⁻¹). Figura 20 pode-se observar o bom desenvolvimento apresentado pela levedura.

Figura 20 – Crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L⁻¹ de glicose e sais minerais, incubado a 30 °C durante 24 h.



O inóculo inicial para cada fermentação foi de 0,18 g de células da levedura. Na concentração de 20 g.L⁻¹ de glicose foi obtido o maior desenvolvimento celular (1,92 g.L⁻¹ de biomassa) quando o meio de cultura foi agitado a 100 rpm. Esta concentração apresentou a menor fase de adaptação (fase lag) em 6 h de fermentação. Quando o meio foi agitado a 50 rpm foram produzidos 1,78 g.L⁻¹ de biomassa e para o meio sem agitação (0 rpm) foram obtidos 1,70 g.L⁻¹. Este mesmo comportamento se repetiu para as três rotações testadas (Figura 20).

Na concentração de 40 g.L⁻¹ o maior desenvolvimento (1,99 g.L⁻¹) ocorreu na velocidade de agitação de 50 rpm. A fase de adaptação para 100 rpm foi a menor (6 h). Para 50 rpm foi de 8 h e quando o meio ficou sem agitar (0 rpm) foi de 10 h indicando que a levedura necessita da incorporação de oxigênio para absorção dessa hexose, embora não seja necessário para seu transporte. Este comportamento foi observado em células cultivadas aerobicamente quando comparada com células cultivadas anaerobicamente, indicando que o oxigênio induziu ou ativou um sistema de transporte (HAHN-HAGERDAL et al., 1994). Após, inicia-se a fase exponencial e passado esse tempo de adaptação o comportamento da levedura foi similar para as três rotações testadas (Figura 20).

Na concentração em que houve a maior disposição de glicose (60 g.L⁻¹), o maior crescimento celular ocorreu em 0 e 50 rpm (2,20 g.L⁻¹). Entretanto, o tempo de adaptação foi de 8 h para as três rotações testadas. Em 100 rpm o crescimento foi de 1,88 g.L⁻¹ de biomassa.

Os valores obtidos para o desenvolvimento da levedura nas concentrações de glicose (20, 40 e 60 g.L⁻¹) testadas, embora estejam muito próximos, foi maior para a agitação de 100 rpm, onde também apresentou a maior fase lag (Figura 20).

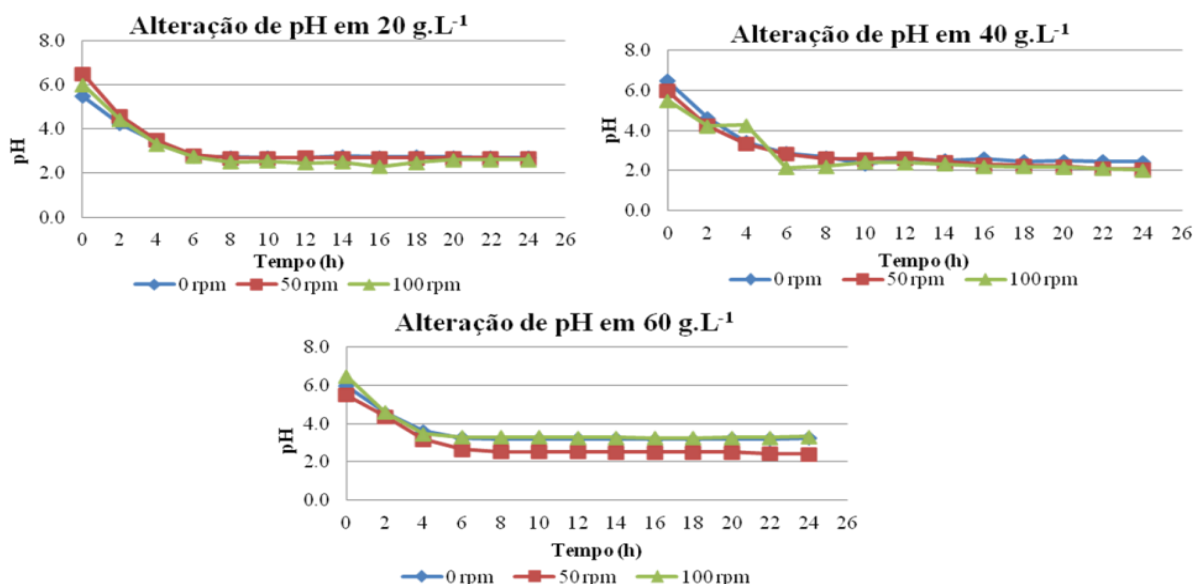
O pH do meio de fermentação diminuiu devido ao aumento da biomassa, uma vez que, durante seu desenvolvimento ocorre a absorção da glicose e a liberação de ácidos e outros subprodutos do seu metabolismo, consequentemente, diminui o pH do meio de cultivo. Essas alterações estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Alteração de pH nas concentrações de 20, 40 e 60 g.L⁻¹ com desvio padrão de $\pm 0,01$.

Tempo (h)	20			40			60		
	0 rpm	50 rpm	100 rpm	0 rpm	50 rpm	100 rpm	0 rpm	50 rpm	100 rpm
0	5.50	6.50	6.00	6.50	6.00	5.50	6.00	5.50	6.50
2	4.25	4.60	4.43	4.63	4.26	4.23	4.57	4.38	4.59
4	3.39	3.50	3.32	3.42	3.33	4.28	3.61	3.18	3.46
6	2.76	2.82	2.75	2.87	2.84	2.14	3.25	2.65	3.29
8	2.73	2.68	2.51	2.66	2.61	2.20	3.19	2.53	3.30
10	2.71	2.69	2.54	2.32	2.57	2.41	3.21	2.52	3.29
12	2.70	2.72	2.47	2.57	2.62	2.39	3.20	2.52	3.28
14	2.77	2.69	2.50	2.50	2.43	2.32	3.20	2.51	3.28
16	2.73	2.69	2.30	2.61	2.30	2.20	3.17	2.50	3.26
18	2.75	2.68	2.49	2.47	2.26	2.19	3.19	2.51	3.26
20	2.73	2.69	2.60	2.48	2.21	2.17	3.20	2.51	3.27
22	2.71	2.69	2.61	2.46	2.10	2.10	3.21	2.43	3.28
24	2.71	2.66	2.61	2.44	2.08	2.02	3.25	2.42	3.33

O pH no final das fermentações (após 24 h) diminuiu drasticamente, passou de 6,5 para 2,66 na concentração de 20 g.L⁻¹ de glicose e agitação de 50 rpm; em 40 g.L⁻¹ terminou em 2,02 (100 rpm); e, para 60 g.L⁻¹ o pH ao final foi de 2,42 (50 rpm). Portanto, foi possível verificar que, mesmo triplicando a concentração da fonte de carbono oferecida não ocorreram variações drásticas do valor do pH do meio. Ainda, foi possível observar que o pH do meio de fermentação não foi influenciado pela agitação, pois, apresentou a mesma variação nas velocidades de rotações de 0, 50 e 100 rpm. A Figura 21 mostra o decréscimo no pH do meio conforme houve o desenvolvimento da levedura.

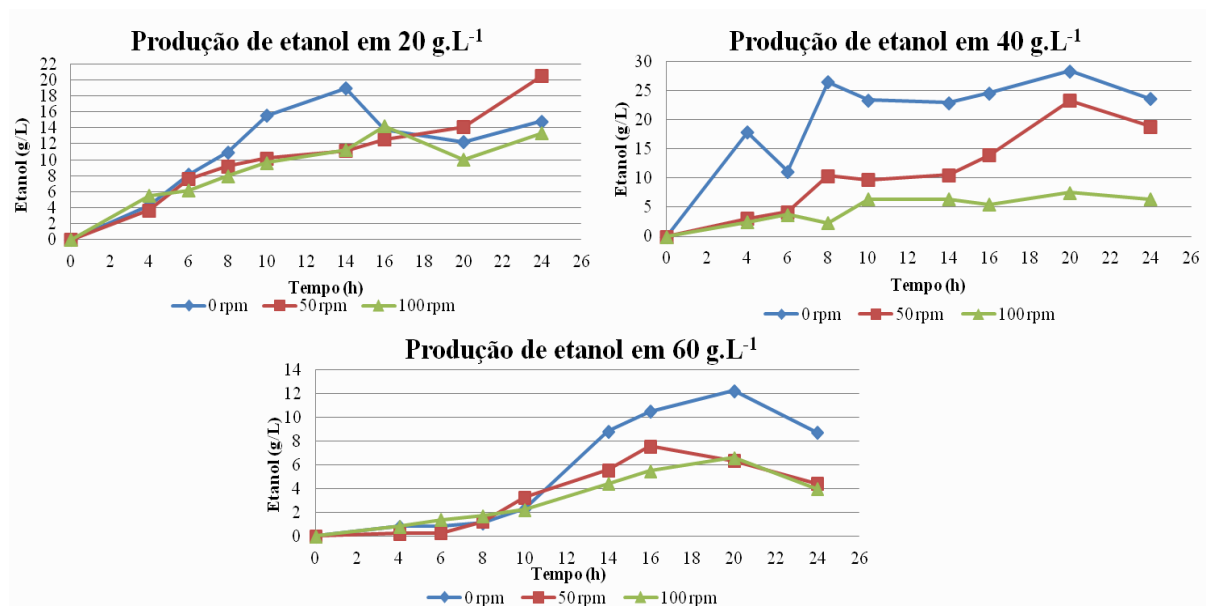
Figura 21 – Alteração de pH no meio de fermentação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L⁻¹ de glicose e sais minerais, incubado a 30 °C durante 24 h.



A avaliação do pH do meio de cultivo durante a fermentação é uma forma de analisar o andamento do processo, pois com o aumento da produção de etanol também são liberados CO₂, ácido acético e de ácidos orgânicos, e o pH vá diminuindo (Figura 21).

A Figura 22 mostra que o teor de etanol produzido pela levedura *S. cerevisiae* no meio sintético adicionado de 40 g.L⁻¹ de glicose e sem agitação (0 rpm) foi de 26,50 g.L⁻¹ de etanol em 8 h de fermentação e após 20 h esse valor chegou a 28,37 g.L⁻¹. Com 50 rpm foi de 23,30 g.L⁻¹ em 20 horas de fermentação, para os dois parâmetros o pH inicial foi de 6,5 e 6,0, respectivamente. Com agitação de 100 rpm todas as concentrações de etanol diminuíram e o valor máximo obtido foi de 7,50 g.L⁻¹ (Figura 22).

Figura 22 – Produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L⁻¹ de glicose e sais minerais incubado a 30 °C durante 24 h.



A Figura 22 apresenta a produção de etanol nas diferentes concentrações de glicose adicionadas no meio sintético usando diferentes velocidades de agitação. Na concentração de 20 g.L⁻¹ a levedura *S. cerevisiae* produziu 18,95 g.L⁻¹ de etanol em 0 rpm e 20,52 g.L⁻¹ em 50 rpm durante 24h de fermentação. Em 100 rpm esse valor diminuiu para 14,22 g.L⁻¹.

Na concentração de 60 g.L⁻¹ dessa fonte de carbono os maiores teores de etanol foram 12,25; 7,59 e 6,59 g.L⁻¹ em 0, 50 e 100 rpm, respectivamente. Indicando que em menor agitação houve maior produção de etanol, e que maior velocidade de agitação em um cultivo aeróbio promove a redução da formação desse produto estimulando o crescimento. Este efeito é mais drástico na fase estacionária e na fase exponencial. Além disso, durante o crescimento respiratório a *S. cerevisiae* consome mais energia e na carência da fonte de carbono, pode consumir o próprio etanol como fonte de carbono para sua sobrevivência (STAHL et al., 2004). Portanto, a agitação mecânica não é necessária durante o processo. Isto diminuiria o custo da aplicação industrial.

Os menores valores na produção de etanol foram obtidos no meio de cultura adicionado de 60 g.L⁻¹ de glicose (Figura 22). Isto pode ser devido a uma maior concentração de substrato gerar um estresse osmótico nos micro-organismos, reduzindo a atividade das enzimas da rota fermentativa, uma vez que, as altas concentrações de açúcares retardam o

mecanismo de produção de etanol nas células diminuindo o rendimento e a produtividade de etanol (NAGHSHBANDI et al., 2019).

Além disso, após 12 horas de fermentação, a glicose já estava quase esgotada, e consequentemente, a escassez dessa fonte de carbono levou a levedura a usar o próprio produto do metabolismo secundário (etanol), causando uma ligeira diminuição nos níveis de etanol. Lavová et al (2014) avaliaram duas cepas de *Saccharomyces* e constataram que a mudança diauxica ocorria após 8 a 12 horas de incubação. O desenvolvimento das leveduras é controlado em parte pela disponibilidade de nutrientes. Quando as células de levedura são crescidas em culturas líquidas em meios ricos em glicose, elas metabolizam este açúcar predominantemente pela via glicolítica, liberando etanol no meio de cultura. Quando a glicose torna-se limitante, ocorre uma diminuição da taxa de crescimento e do metabolismo por comutação de glicólise aeróbia para utilização de etanol, e essa alteração do crescimento é conhecida como deslocamento diauxico, como pode ser observado na Figura 22 (LAVOVÁ et al., 2014).

Nas Figuras 20, 21 e 22 observa-se também que, em maior velocidade de rotação a levedura apresentou maior consumo de açúcar, maior desenvolvimento celular e maior diminuição do pH. Já em velocidades de agitação menores houve a maior produção de etanol.

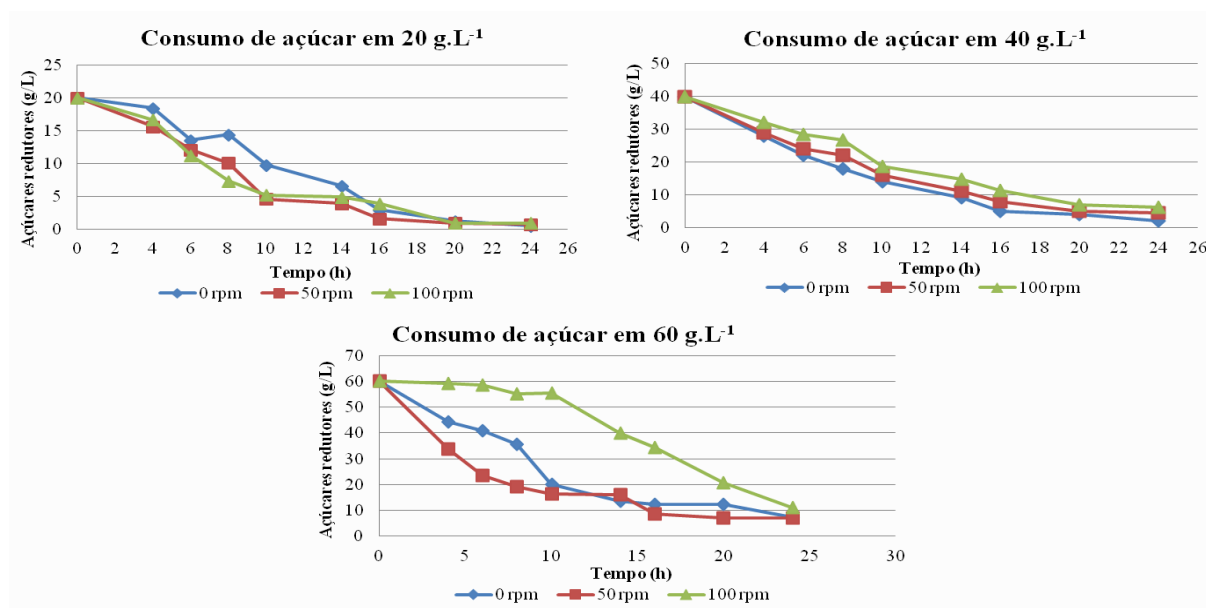
A produtividade na produção de etanol foi maior nas primeiras horas de fermentação em todas as concentrações de glicose adicionadas ao meio de cultura.

A mais alta taxa de produtividade foi de $4,46 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ alcançada em 4 horas de fermentação e pH inicial de 6,5 para 40 g.L^{-1} de glicose. Nestas mesmas condições em 8 h de fermentação foi de $3,31 \text{ g.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$; e em 24 h foi de $0,98 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de produtividade.

Para as concentrações de glicose 20 e 60 g.L^{-1} a maior produtividade alcançada foi de $1,55 \text{ g.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ em 10 h de fermentação e $0,65 \text{ g.h.L}^{-1}$ em 16 h de processo, respectivamente. Esses valores foram obtidos nos meios de cultura sem agitação (0 rpm).

A Figura 23 mostra o consumo da glicose pela levedura. Nesta, pode ser observado que em 24 h de fermentação o consumo foi total em todas as concentrações de glicose, em todas as velocidades de agitação e todos os pH testados. Indicando a ótima capacidade da *S. cerevisiae* de produção de etanol e que, a produção de etanol desta levedura dependerá da viabilidade celular e do tempo de processo.

Figura 23 – Consumo de açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L⁻¹ de glicose e sais minerais incubado a 30 °C durante 24 h.



A produção de etanol pela *S. cerevisiae* também pode ser afetada pela produção de biomassa e outros metabólitos produzidos durante a fermentação, como ácidos orgânicos, ésteres, etc., uma vez que, o carbono fermentável também pode ser direcionado para outras vias metabólicas. Nos processos industriais para produção de etanol, até 4% da matéria-prima do açúcar utilizado como substrato é convertido em glicerol, o que representa uma perda indesejada dessa fonte de carbono (VAN AALST et al., 2022).

Na Tabela 13 pode ser observado que durante a fermentação praticamente não houve formação de compostos fenólicos no meio de cultura. Ainda, em algumas amostras foi possível observar os compostos aumentarem com o tempo de fermentação, porém, esses valores, poderiam ser devidos à leitura de outros materiais que absorvam no mesmo comprimento de onda.

Tabela 13 – Compostos fenólicos em 20, 40 e 60 g.L⁻¹ obtidos dos meios fermentados pela levedura *S. cerevisiae*.

Tempo (h)	20 g.L ⁻¹			40 g.L ⁻¹			60 g.L ⁻¹		
	0 rpm	50 rpm	100 rpm	0 rpm	50 rpm	100 rpm	0 rpm	50 rpm	100 rpm
4	0.006	0.014	0.143	0.005	0.012	0.014	0.080	0.079	0.083
6	0.012	0.012	0.129	0.007	0.012	0.011	0.060	0.066	0.077
8	0.005	0.005	0.087	0.010	0.020	0.014	0.050	0.043	0.098
10	0.009	0.005	0.048	0.012	0.022	0.016	0.060	0.051	0.088
14	0.012	0.005	0.109	0.014	0.059	0.018	0.080	0.082	0.104
16	0.012	0.010	0.079	0.015	0.059	0.016	0.090	0.108	0.090
20	0.014	0.012	0.231	0.018	0.078	0.019	0.100	0.112	0.100
24	0.008	0.014	0.264	0.020	0.084	0.019	0.112	0.079	0.110

5.3.1.2 Estudo do comportamento da levedura *Pachysolen tannophilus* em meio sintético adicionado de diferentes concentrações de glicose

As fermentações foram realizadas utilizando as diferentes concentrações de glicose, submetidas a diferentes pH iniciais (5,5; 6,0 e 6,5) e agitação (0; 50 e 100 rpm) na temperatura de 30 °C durante 24 h de incubação. Foram realizadas 10 combinações com uma repetição no ponto central, em triplicata, para cada meio sintético. As análises foram realizadas a cada 2 h.

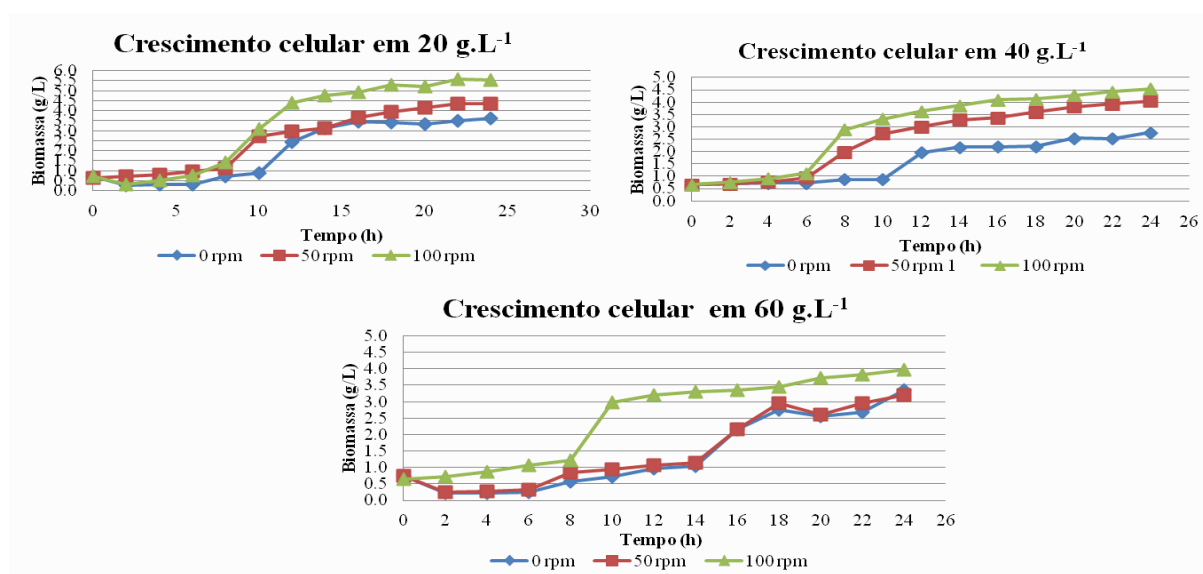
Em comparação com o crescimento das leveduras *S. cerevisiae* em meio adicionado de glicose itens (5.2.1.1) e *P. tannophilus* em meio contendo xilose (5.2.1.3) a maior formação de biomassa foi pela levedura *Pachysolen tannophilus* em meio adicionado com 20 g.L⁻¹ de glicose, sendo de 5,56 g.L⁻¹ em 100 rpm.; e 4,35 g.L⁻¹ em 50 rpm. Sem agitação (0 rpm) foi de 3,60 g.L⁻¹ de células (Figura 24).

Quando o meio de cultura foi adicionado com 40 g.L⁻¹ de glicose a levedura cresceu 4,54 g.L⁻¹ e 4,05 g.L⁻¹ para 100 e 50 rpm, respectivamente. Sem agitação (0 rpm) o crescimento foi menor de 2,77 g.L⁻¹ de biomassa. Com meio inicial de 60 g.L⁻¹ de glicose os crescimentos ao final da fermentação (24 h) foram de 3,34; 3,19 e 3,98 g.L⁻¹ para sem rotação (0 rpm), 50 e 100 rpm, respectivamente.

A partir da Figura 24 verifica-se que no meio fermentado com agitação de 100 rpm ocorreu o maior crescimento celular da levedura para as três concentrações de açúcares (20, 40 e 60 g.L⁻¹). De acordo com Melo et al. (2007), além da oxigenação, a agitação também facilita a homogeneidade do meio, permitindo um melhor acesso do micro-organismo ao substrato. No entanto, a agitação de até 100 rpm pode aumentar, consideravelmente, a oxigenação do meio e,

segundo Ishikawa; Nobayashi; Tanaka (1990), o oxigênio desvia a via metabólica de síntese de etanol para produção de acetaldeído, o qual inibe o crescimento celular dos micro-organismos.

Figura 24 – Crescimento celular da levedura *Pachysolen tannophilus* com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L⁻¹ de glicose e sais minerais, incubado a 30 °C durante 24 h.



Também é possível observar que a agitação pouco influenciou o pH, uma vez que, os valores determinados foram muito similares entre as diferentes concentrações iniciais de glicose do meio de cultura (Tabela 14).

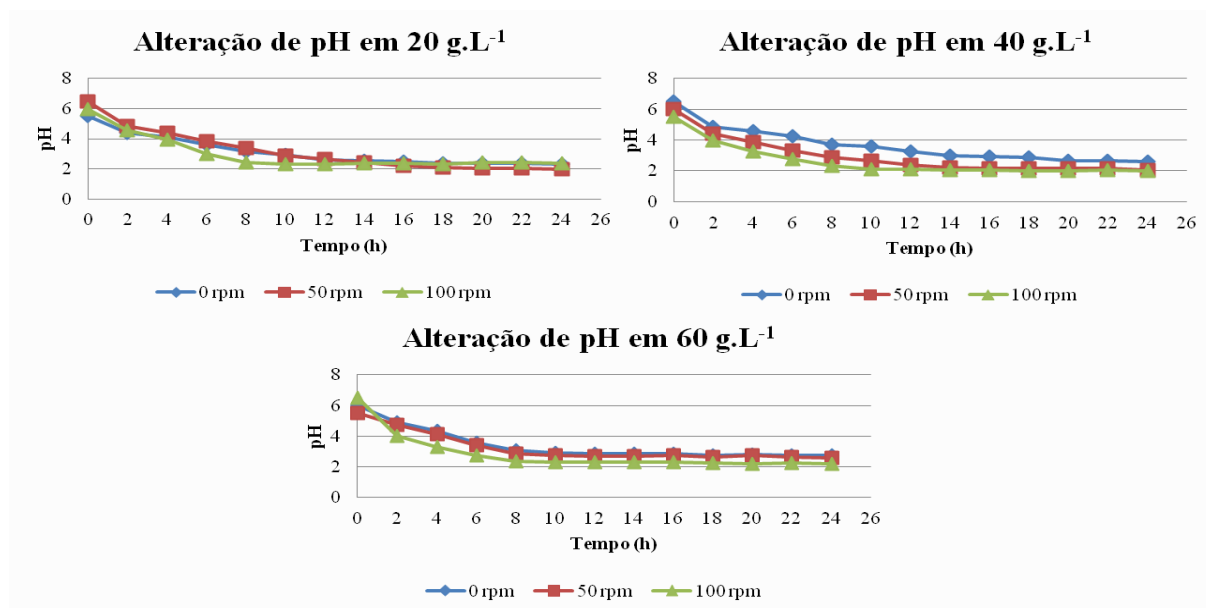
Tabela 14 – Alteração de pH nas concentrações de 20, 40 e 60 g.L⁻¹ com desvio padrão de $\pm 0,01$.

Tempo (h)	20 g.L ⁻¹			40 g.L ⁻¹			60 g.L ⁻¹		
	0 rpm	50 rpm	100 rpm	0 rpm	50 rpm	100 rpm	0 rpm	50 rpm	100 rpm
0	5.50	6.50	6.00	6.50	6.00	5.50	6.00	5.50	6.50
2	4.38	4.82	4.54	4.84	4.42	3.96	4.88	4.74	4.04
4	4.14	4.40	3.96	4.56	3.88	3.28	4.37	4.15	3.32
6	3.62	3.86	3.01	4.23	3.33	2.75	3.58	3.39	2.76
8	3.18	3.38	2.41	3.73	2.90	2.33	3.05	2.87	2.34
10	2.93	2.87	2.32	3.57	2.64	2.12	2.93	2.72	2.32
12	2.61	2.64	2.32	3.25	2.39	2.09	2.84	2.70	2.32
14	2.54	2.42	2.35	2.98	2.21	2.06	2.84	2.70	2.31
16	2.49	2.21	2.39	2.92	2.15	2.04	2.85	2.72	2.30
18	2.36	2.06	2.34	2.90	2.14	2.02	2.73	2.66	2.22
20	2.39	2.01	2.40	2.68	2.16	2.01	2.81	2.73	2.21
22	2.39	2.01	2.42	2.65	2.14	2.04	2.75	2.66	2.24
24	2.33	2.00	2.39	2.59	2.04	2.02	2.72	2.56	2.20

Assim como o que foi observado para a *S. cerevisiae*, em todos os meios utilizados houve diminuição do pH. Este mesmo comportamento foi observado em todas as concentrações

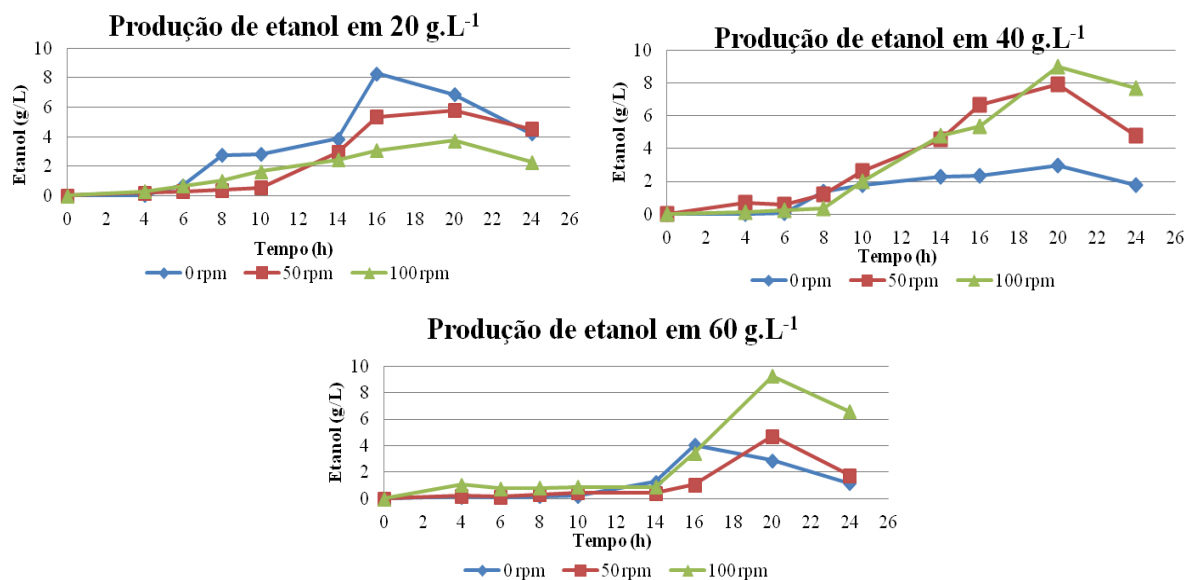
da fonte de carbono adicionada, pH iniciais e agitação. A Figura 25 apresenta as alterações do pH do meio de cultura fermentado pela levedura *Pachysolen tannophilus* sob diferentes condições em 24 h de incubação.

Figura 25 – Alteração de pH no meio de fermentação da levedura *Pachysolen tannophilus* com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L⁻¹ e sais minerais, incubado a 30 °C durante 24 h.



A produção de etanol por *P. tannophilus* nos meios com a adição de glicose em 40 e 60 g.L⁻¹ foi maior com o uso de agitação e os resultados obtidos para as três concentrações foram muito próximos (Figura 26). Os maiores teores de etanol em 40 e 60 g.L⁻¹ de glicose, foram de 9,01 g.L⁻¹ para 40 g.L⁻¹ e 9,24 g.L⁻¹ em 60 g.L⁻¹. Estas duas produções foram obtidas utilizando agitação de 100 rpm durante 20 h de processo. Já a concentração de 20 g.L⁻¹ promoveu a formação de 8,30 g.L⁻¹ sem agitação (0 rpm) em 16 h de fermentação.

Figura 26 – Produção de etanol pela levedura *Pachysolen tannophilus* com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L⁻¹ e sais minerais incubado a 30 °C durante 24 h.



Em uma pesquisa realizada por STAHL et al., (2004) foi constatado que as células de levedura crescem exponencialmente durante a fermentação, dobrando o tamanho da população a cada 90 min. Após consumo de todas as fontes de carbono fermentáveis, as células da levedura mudam a via metabólica e passam por uma adaptação à nova fonte de carbono (etanol presente no meio de cultura), com esta mudança ocorre um atraso do crescimento chamado deslocamento ou crescimento diáuxico (STAHL et al., 2004). Isso explicaria a queda na concentração de etanol após 16 ou 20 horas de processo (Figura 26).

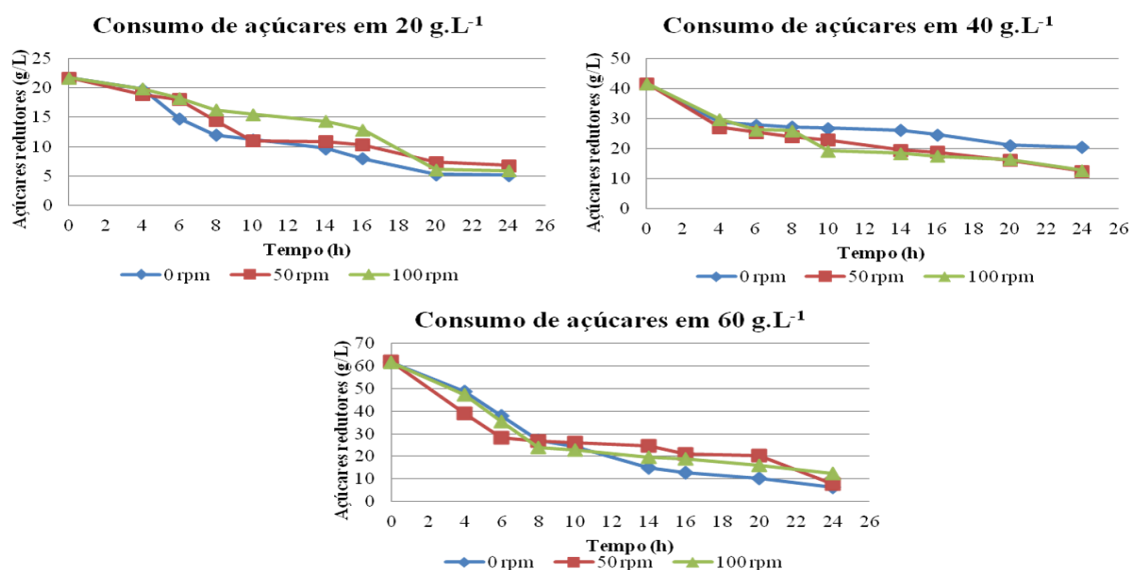
O crescimento e a produção de etanol pela levedura *P. tannophilus* indicam que é necessário que haja a agitação do meio, diferentemente da levedura *S. cerevisiae* que apresentou as melhores produções de etanol em meios sem agitação.

A maior produtividade obtida neste processo fermentativo foi 0,51 g.h⁻¹.L⁻¹ em 16 h de fermentação, na concentração inicial de glicose de 20 g.L⁻¹ sem agitação (0 rpm). Em 20 h de fermentação na agitação de 100 rpm nas concentrações de 40 e 60 g.L⁻¹ de glicose produtividade foi de 0,45 g.h⁻¹.L⁻¹ e 0,46 g.h⁻¹.L⁻¹, respectivamente.

A levedura pode ter grande desenvolvimento celular produzir outros metabolitos, como por exemplo, o glicerol que é produzido no citosol da levedura juntamente com o etanol. Por isso, apesar da alta concentração celular da *P. tannophilus* não houve alta produção de etanol, e ainda, há uma queda na concentração do etanol produzido, pois a levedura pode gerar os subprodutos glicerol e/ou xilitol e reduzir a eficiência de produção de etanol.

A Figura 27 apresenta o consumo das diferentes concentrações de glicose adicionadas ao meio de cultura durante 24 h de fermentação. Nesta observa-se que a levedura consumiu o açúcar durante todo o processo fermentativo.

Figura 27 – Consumo de açúcares pela levedura *Pachysolen tannophilus* com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L⁻¹ e sais minerais incubado a 30 °C durante 24 h.



Algumas pesquisas apontam que a *Pachysolen tannophilus* pode utilizar glicerol como fonte de carbono para produção de etanol. Por exemplo, Liu et al. (2012) utilizaram glicerol como única fonte de carbono, concentração inicial de 25 g.L⁻¹, durante 90 horas de fermentação produzindo 6,0 g.L⁻¹ de etanol. Outro estudo também com glicerol, porém com a *P. tannophilus* imobilizada em criogel relatou uma produção de 8,20 g.L⁻¹ de etanol e produtividade de 0,39 g.h⁻¹.L⁻¹ em uma fermentação de 24 h (STEPANOV; EFREMENKO, 2017). Os maiores teores de etanol obtidos na presente pesquisa foram produzidos em menor tempo de processo, a partir de 16 h de fermentação, e maiores teores, de 8,30; 9,01 e 9,24 g.L⁻¹. A produtividade obtida foi de 0,51 g.h⁻¹.L⁻¹ em 16 h de fermentação; e 0,45 g.h⁻¹.L⁻¹ e 0,46 g.h⁻¹.L⁻¹ em 20 h.

Apesar de os melhores resultados de crescimento e produção de etanol serem obtidos em 100 rpm, um alto teor de oxigênio do meio de cultura pode levar a produção de subprodutos inibidores afetando a fermentação alcoólica (ISHIKAWA; NOBAYASHI; TANAKA, 1990), por esse motivo foi selecionada a agitação de 50 rpm, pH inicial de 6,5 e a concentração inicial de 40 g.L⁻¹.

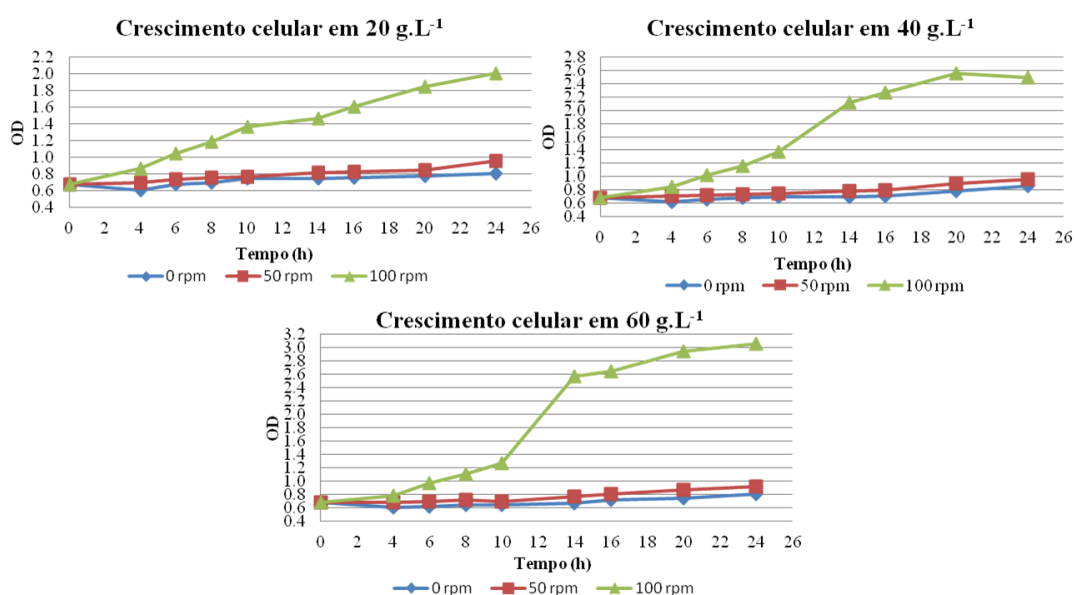
5.3.1.3 Estudo do comportamento da levedura *Pachysolen tannophilus* em meio sintético adicionado de diferentes concentrações de xilose

Nestes ensaios a levedura *P. tannophilus* foi fermentada em concentrações iniciais de 20; 40 e 60 g.L⁻¹ de xilose submetidas a diferentes pH iniciais (5,5; 6,0 e 6,5) e agitação (0; 50 e 100 rpm) na temperatura de 30 °C durante 24 h de incubação.

A D-xilose, uma pentose, é o principal produto da hidrólise da hemicelulose de muitos materiais vegetais, onde pode representar em torno de um terço dos açúcares redutores. A levedura *P. tannophilus* apresenta enzimas xilose redutase e xilose isomerase que lhe conferem a capacidade de metabolizar essa fonte de carbono para produzir etanol.

Na fermentação em meio contendo xilose a levedura apresentou bom crescimento, principalmente quando utilizada a rotação de 100 rpm (Figura 28).

Figura 28 – Crescimento celular da levedura *Pachysolen tannophilus* em meio contendo xilose com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L⁻¹ e sais minerais, incubado a 30 °C durante 24 h.



Como apresentado nesta Figura 27, ficou evidente o maior desenvolvimento da *P. tannophilus* foi com a rotação de 100 rpm para todas as concentrações de xilose adicionadas ao meio de cultura. Com 60 g.L⁻¹ o crescimento foi de 3,05 g.L⁻¹ de células; em concentração inicial de 40 g.L⁻¹ foi de 2,50 g.L⁻¹ e em 20 g.L⁻¹ o maior desenvolvimento foi de 2,03 g.L⁻¹.

A agitação do meio favoreceu o crescimento celular. Em contrapartida, um processo onde se tenha a conversão de fontes de carbono voltadas principalmente para manutenção do

crescimento celular do micro-organismo pode não ser vantajoso, pois, além da grande quantidade de biomassa formada, a concentração de etanol nos meios não aumentou de forma proporcional ao crescimento. Isso pode ser explicado pelo fato de que a levedura não só produz o etanol como produto do metabolismo microbiano, mas também outro metabólito (glicerol), no qual esta via pode estar sendo favorecida pela agitação. Deste modo, o oxigênio foi necessário para o crescimento de *Pachysolen tannophilus* em D-xilose, bem como em D-glicose (HAHN-HAGERDAL et al., 1994).

Em comparação com o meio sintético composto por glicose, o crescimento em meio composto por xilose foi menor. A glicose é preferida à xilose na fermentação por *P. tannophilus*, onde essa levedura cresce melhor. Assim como a maioria dos micro-organismos esta levedura prefere a glicose a outros açúcares monoméricos e não assimila outros açúcares até que a glicose seja consumida, pois, os açúcares são assimilados sequencialmente. A utilização simultânea de glicose e outros açúcares são raramente observados (GANCEDO, 1998; STULKE; HILLEN, 1999).

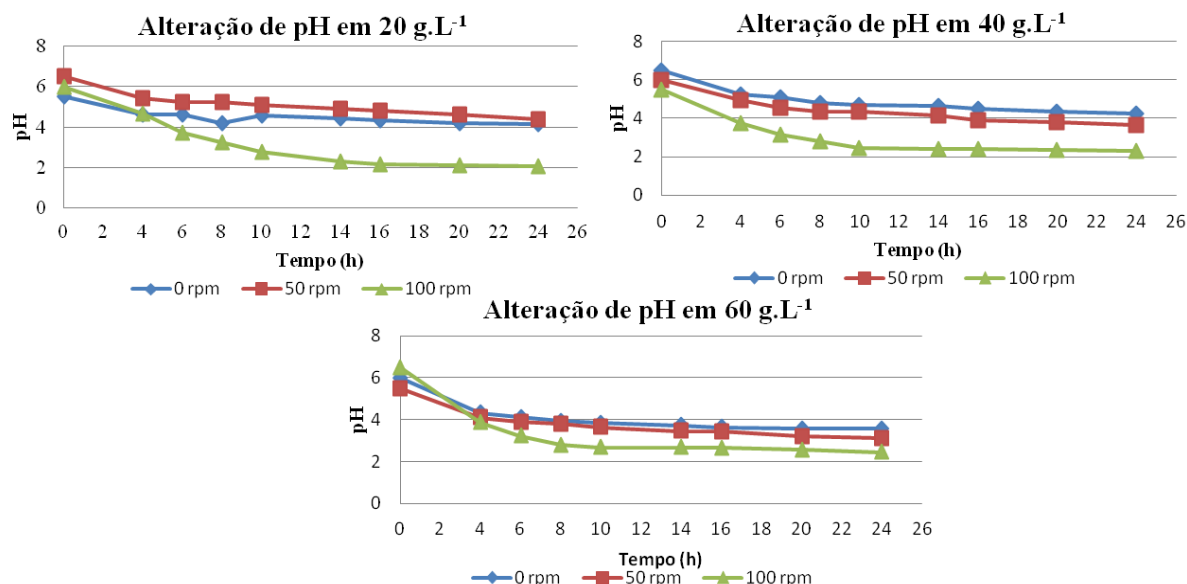
Ainda assim, a quantidade de formação de biomassa celular foi maior pela *P. tannophilus* em comparação a *S. cerevisiae*. Isso mostra que em menores concentrações celulares há maior teor de etanol, pois, a levedura precisa manter seu desenvolvimento celular, porém, produzir o produto de interesse.

Além do crescimento, houve maior queda no valor de pH nos meios que sofreram agitação de 100 rpm. O comportamento do pH está descrito na Tabela 15 e representado na Figura 29.

Tabela 15 – Alteração de pH nas concentrações 20, 40 e 60 g.L⁻¹.

Tempo (h)	20 g.L ⁻¹			40 g.L ⁻¹			60 g.L ⁻¹		
	0 rpm	50 rpm	100 rpm	0 rpm	50 rpm	100 rpm	0 rpm	50 rpm	100 rpm
0	5.50	6.50	6.00	6.50	6.00	5.50	6.00	5.50	6.50
4	4.63	5.43	4.69	5.25	5.08	3.75	4.32	4.09	3.86
6	4.63	5.25	3.71	5.07	4.67	3.17	4.11	3.88	3.22
8	4.20	5.24	3.24	4.79	4.45	2.79	3.92	3.78	2.79
10	4.56	5.09	2.78	4.69	4.32	2.46	3.84	3.63	2.68
14	4.42	4.92	2.33	4.65	4.21	2.41	3.73	3.45	2.68
16	4.34	4.82	2.16	4.49	3.93	2.4	3.64	3.42	2.66
20	4.19	4.61	2.11	4.35	3.91	2.34	3.55	3.21	2.57
24	4.16	4.39	2.07	4.26	3.77	2.3	3.55	3.10	2.45

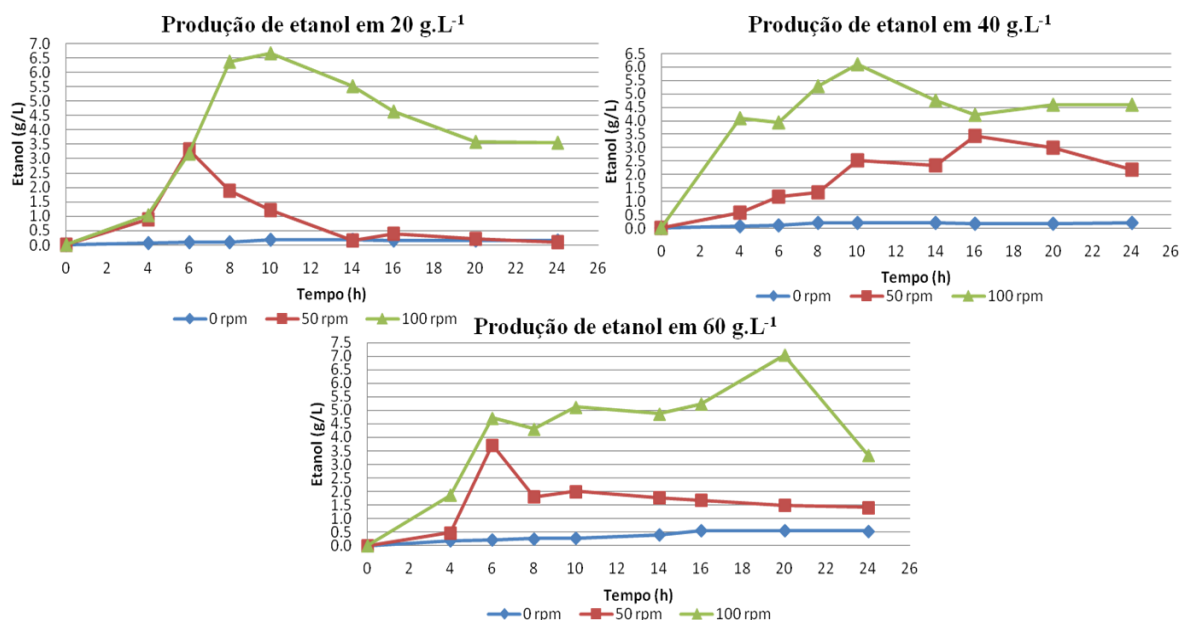
Figura 29 – Alteração de pH no meio de fermentação da levedura *Pachysolen tannophilus* em meio contendo xilose com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais dos meios sintéticos formados por 20, 40 e 60 g.L⁻¹ e sais minerais, incubado a 30 °C durante 24 h.



A levedura *P. Tannophilus* mostrou que, para maior produção de etanol, em um meio contendo glicose ou contendo xilose, é indispensável o uso da agitação do meio de cultura. Diferentemente da levedura *S. cerevisiae* que apresentou as melhores produções de etanol em meios sem agitação. A agitação de 100 rpm mostrou o maior crescimento contudo, a produção de etanol diminuiu devido ao consumo do álcool como uma fonte de carbono (Figuras 28 e 30).

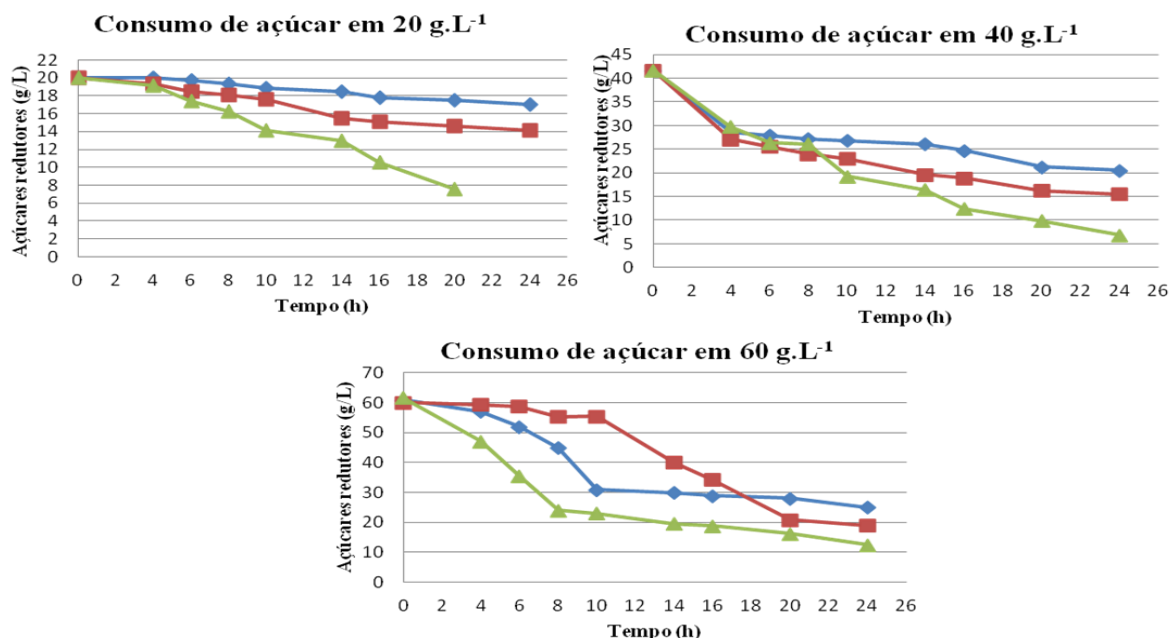
Com a agitação de 100 rpm houve a produção de etanol de 7,05; 6,09 e 6,65 g.L⁻¹ em 20, 40 e 60 g.L⁻¹ iniciais de xilose, respectivamente. Nesta velocidade de agitação, quando a utilização de xilose estava em torno de 10 horas, a concentração de etanol foi a mais elevada, enquanto o perfil de crescimento da levedura aumentou no decorrer do tempo de fermentação (Figura 28), isto poderia explicar o declínio no teor de etanol, pois este foi consumido como fonte de carbono (Figura 30).

Figura 30 – Produção de etanol pela levedura *Pachysolen tannophilus* em meio contendo xilose com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L⁻¹ de glicose e sais minerais incubado a 30 °C durante 24 h.



Nos ensaios sem agitação (0 rpm) a levedura apresentou pouco desenvolvimento celular e praticamente não produziu etanol, sendo seu máximo teor de produção de 0,19 g.L⁻¹ na concentração inicial de 20 g.L⁻¹ de xilose. Em 40 g.L⁻¹ de xilose a maior produção desta levedura em 0 rpm foi de 0,21 g.L⁻¹ de etanol. Em 60 g.L⁻¹ iniciais esse teor também foi baixo, de 0,56 g.L⁻¹. Provavelmente este fato está relacionado à levedura não receber aeração em seu meio que não sofreu agitação, pois, estudos apontam que em leveduras fermentadoras de xilose a produção de xilitol aumenta em condição de anaerobiose e a produção de etanol aumenta em condições de limitação de oxigênio (LIGTHELM et al., 1988; VERAS; PARACHIN; ALMEIDA, 2017). Este evento foi observado nas três diferentes concentrações de açúcares e três pH testados, além do mais, as diferentes agitações apresentaram o mesmo perfil de desenvolvimento e produção de etanol.

Figura 31 – Consumo de açúcares pela levedura *Pachysolen tannophilus* em meio contendo xilose com agitação de 0, 50 e 100 rpm variando os pH iniciais do meio sintético formado por 20, 40 e 60 g.L⁻¹ de glicose e sais minerais incubado a 30 °C durante 24 h.



Na velocidade de agitação de 100 rpm foi observada a maior assimilação da xilose pela levedura. Este açúcar diminuiu rapidamente durante as primeiras 8 horas de fermentação das três diferentes concentrações iniciais. Nesta velocidade a levedura utilizou a xilose mais rápida e eficazmente, uma vez que, a concentração de açúcares residuais foi menor do que para a agitação de 50 ou sem agitação, simultaneamente, o desenvolvimento celular e a produção de etanol foram maiores. Em 50 rpm a levedura apresentou maior consumo do açúcar do que sem a agitação (Figura 32).

5.3.1.4 Estudo do comportamento do consórcio entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* em meio sintético de glicose ou xilose

Para o consórcio das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* foram testadas as melhores condições utilizadas para a fermentação dos meios sintéticos. Foram utilizados 40 g.L⁻¹ de glicose ou xilose, pH inicial de 6,5; sem agitação para *S. cerevisiae* e agitação de 50 rpm para *P. tannophilus*, incubadas a 30°C, durante 24 h.

Inicialmente foi inoculado a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e após as 12 ou 14 primeiras horas esta levedura foi substituída nos meios de cultivo por *Pachysolen*

tannophilus CCT 1881 até o final do processo (24 horas). Em um dos ensaios as duas leveduras foram inoculadas no início da fermentação (ensaio 6). Foram analisados os parâmetros em relação a pH, crescimento celular, produção de etanol e açúcares residuais a partir de 4 horas do início da fermentação e, após em intervalos de 2 horas até o término do processo fermentativo de 24 horas (Tabela 16).

A Tabela 16 resume os resultados médios de concentração de biomassa celular formada, produção de etanol e a produtividade, obtidos para cada ensaio durante o processo de fermentação. Também apresenta o açúcar (glicose ou xilose), a concentração inicial da fonte de carbono, a velocidade de agitação utilizada no meio, o pH inicial e final e o tempo em que houve a adição da levedura *P. tannophilus*.

Tabela 16 – Resultados dos ensaios do consórcio das leveduras *S. cerevisiae* e *P. tannophilus*, meios e concentrações da fonte de carbono, velocidade de agitação, pH e tempo em que ocorreu a inoculação de troca da levedura, produção de biomassa, etanol e produtividade.

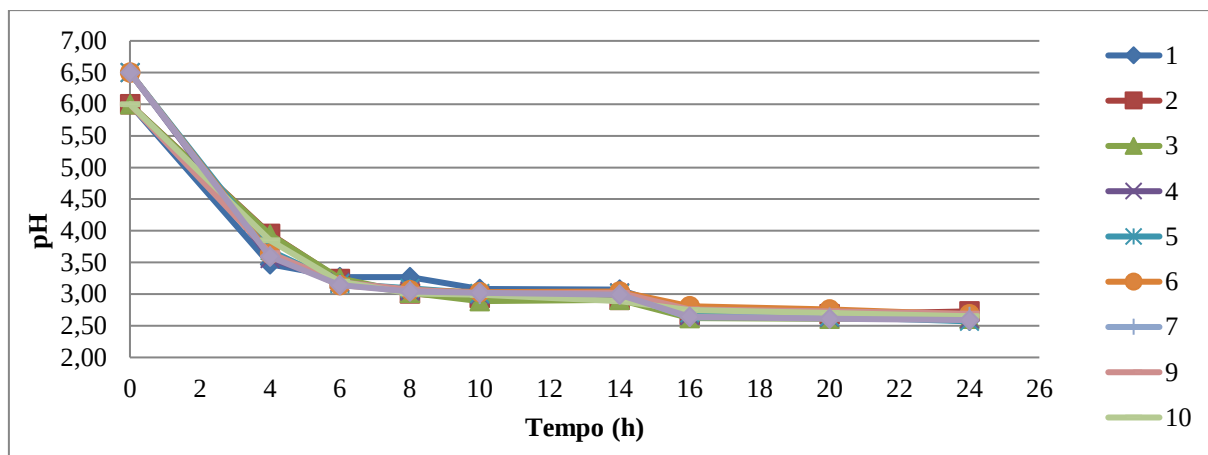
Ensaio	Fonte de Carbono	Substrato (g/L)	Agitação (rpm)	pH inicial	pH final	Tempo (h)	Biomassa (mg/mL)	Etanol (mg/mL)	Produtividade (mg/mL.h)
1	Glicose	60	0	6,0	2,58	0	1,57	4,10	0,29
2	Glicose	20	0	6,0	2,73	12	0,90	11,07	1,00
3	Xilose	20	0	6,0	2,61	12	1,18	8,52	0,78
4	Glicose	40	0	6,5	2,61	14	1,58	16,83	1,45
5	Xilose	40	0	6,5	2,57	14	1,46	8,03	0,88
6*	Glicose	40	0	6,5	2,68	0	1,27	12,08	0,85
7	Glicose	40	0	6,5	2,65	12	1,21	11,96	0,89
8	Xilose	40	0	6,5	2,59	12	1,44	6,14	0,42
9	Glicose	40	50	6,5	2,69	14	1,46	10,57	1,07
10	Glicose	40	0	6,0	2,65	0	1,59	21,75	2,05

*As duas leveduras inoculadas no início da fermentação.

A maior produção de biomassa da levedura *S. cerevisiae* ocorreu nos ensaios 1 e 10, quando em consórcio com *P. tannophilus* foi com o meio acrescido de glicose, ensaio 4. Os menores crescimentos celulares ocorreram quando o consórcio foi realizado na concentração inicial de 20 g.L⁻¹ de açúcares (ensaios 2 e 3).

Os pH iniciais utilizados foram 6,0 e 6,5. Após 4 horas de fermentação diminuíram para 2,50 e no final do processo de 24 h o valor foi de 2,57. Mostrando que houve a produção de metabólitos pelas leveduras (Figura 32).

Figura 33 – Consumo de açúcares pelo consórcio das leveduras *S. cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* incubadas a 30 °C durante 24 h.



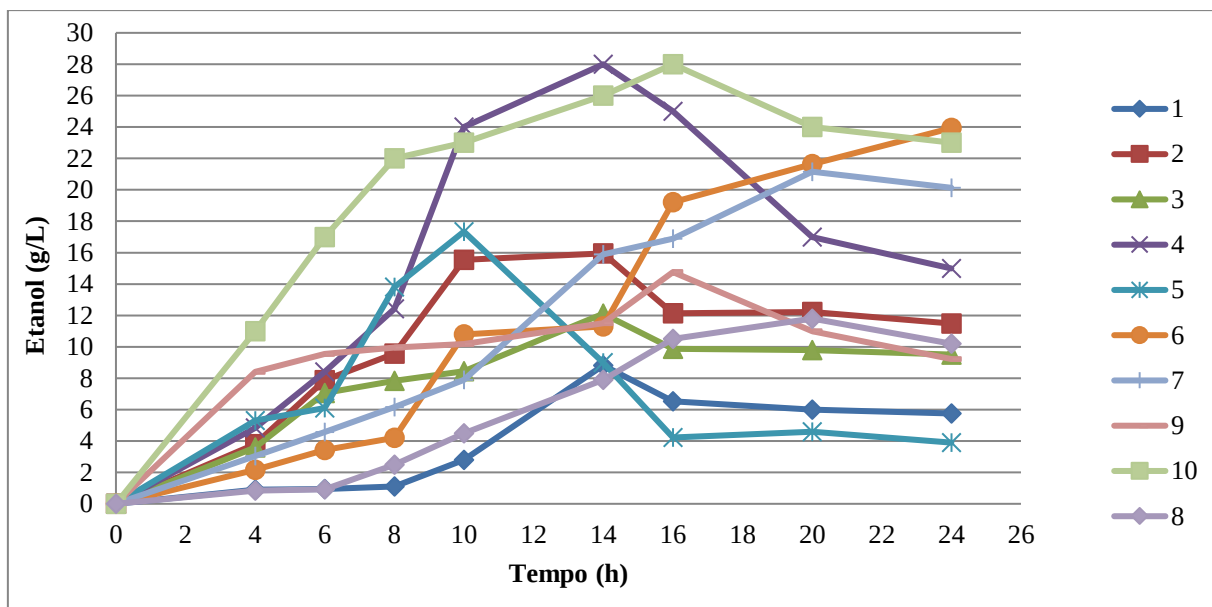
A produção de etanol foi maior quando a levedura *S. cerevisiae* fermentou sozinha (ensaio 10) na concentração inicial de 40 g.L⁻¹ de glicose, resultando em 21,75 g.L⁻¹ de etanol em 16 h; Assim como a maior produtividade (2,05 g.h⁻¹.L⁻¹). Após as 16 h o teor de etanol diminuiu o que indica que a levedura apresentou uma fase de crescimento exponencial utilizando a glicose como principal fonte de energia; então, quando a glicose se esgotou a *S. cerevisiae* entra na fase respiratória, na qual o etanol produzido durante o crescimento fermentativo foi consumido (STAHL et al. , 2004).

O maior teor de etanol obtido pela co-cultura foi no ensaio 4, também com AR inicial de 40 g.L⁻¹ de glicose, onde a *P. tannophilus* também utilizou glicose. A produção de etanol foi de 16,83 g.L⁻¹, com crescimento celular de 1,58 g.L⁻¹, produtividade 1,45 g/h⁻¹.L⁻¹ em pH inicial de 6,5 e sem agitação (Figura 33).

Quando inoculadas juntas ao do processo fermentativo, as duas leveduras estavam em meio sem agitação (0 rpm) e pH inicial 6,5 (ensaio 6). O crescimento celular foi de 1,27 g.L⁻¹; a produção de etanol de 12,08 g.L⁻¹ e a produtividade de 0,85 g.h⁻¹.L⁻¹.

Os ensaios 6 e 9 foram os únicos que apresentaram o contínuo aumento de etanol após a inoculação da *P. tannophilus*. No ensaio 6, as leveduras iniciaram o processo juntas e no ensaio 9 a *P. tannophilus* foi adicionada após 14 h de incubação, a partir disso o meio foi agitado a 50 rpm.

Figura 34 – Produção de etanol pelo consórcio das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* incubadas a 30 °C durante 24 h.



Os parâmetros utilizados para a substituição da glicose ou xilose pelos hidrolisados no consórcio das leveduras foram: a concentração inicial de açúcares de 40 g.L⁻¹, pH inicial de 6,5; sem agitação nas primeiras 14 h de processo e após a inoculação de *P. tannophilus* a agitação foi de 50 rpm.

5.3.1.5 Estudo do comportamento do consórcio entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* nos meios hidrolisados

Nos meios contendo o hidrolisado de sabugo de milho a produção de etanol foi maior naqueles contendo o hidrolisado bruto (meio sem sofrer processo de desintoxicação), onde, o máximo valor obtido foi de 12,35 g L⁻¹ de etanol em 24 horas de fermentação, com pH inicial de 6,5, sem agitação no início da fermentação e após a inoculação da levedura *P. tannophilus* o meio foi agitado a 50 rpm, (Tabela 17). O meio contendo o hidrolisado bruto apresentou ainda o maior desenvolvimento celular. Já no meio contendo o hidrolisado desintoxicado a maior produção de etanol foi de 9,15 g.L⁻¹, após as 24 h de fermentação.

Para o hidrolisado do sisal sem sofrer o processo de desintoxicação a produção de etanol foi 10,50 g.L⁻¹. Para o meio contendo o hidrolisado submetido ao processo de desintoxicação o teor foi de 10,30 g. L⁻¹ (Tabela 17).

No meio de fermentação contendo o hidrolisado bruto de sisal também foi verificado o maior crescimento celular ($1,64 \text{ g.L}^{-1}$), assim como para o sabugo de milho ($1,93 \text{ g.L}^{-1}$). Estes dois substratos (sisal e sabugo de milho) apresentaram também a maior produtividade no meio contendo o hidrolisado bruto. Assim, o processo de desintoxicação utilizando carvão ativado não é uma etapa necessária. Visto que, mesmo na presença de compostos fenólicos estes hidrolisados apresentaram maior desenvolvimento celular e maior produção de etanol 2G, indicando que não houve inibição significativa da atividade microbiana. Tornando o processo fermentativo mais econômico a nível industrial, uma vez que, dispensa a etapa de desintoxicação.

Assim, como estes dois substratos, no meio contendo o hidrolisado de mandioca bruto as leveduras também apresentaram a maior produção de biomassa, de $1,32 \text{ g.L}^{-1}$ e para o meio contendo o hidrolisado desintoxicado a concentração foi de $1,19 \text{ g.L}^{-1}$ (Tabela 17). Este meio que passou pelo processo de desintoxicação apresentou maior teor de etanol ($15,20 \text{ g.L}^{-1}$) e maior produtividade ($1,52 \text{ g.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$). Estes maiores teores foram obtidos em 10 h de fermentação e, a partir deste tempo a levedura apresentou deslocamento diáuxico, pois, metabolizou o etanol produzido. Ainda, em comparação com os outros substratos, este foi o maior teor de produtividade.

Estes resultados indicam houve adaptação das leveduras nos três diferentes meios contendo os hidrolisados dos resíduos.

Tabela 17 – Médias para produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, tempo de maior produção, em pH inicial de 6,5 e concentração inicial de 40 g.L^{-1} de açúcares.

Meios	pH final	Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Etanol (g/L)	Produtividade (g/L.h)	ART final
Sabugo Bruto	4,10	24	1,93	12,35	0,51	5,40
Sabugo desintoxicado	4,10	24	1,19	9,15	0,38	5,01
Sisal Bruto	3,84	22	1,64	10,50	0,47	1,59
Sisal desintoxicado	3,89	24	1,20	10,30	0,42	0,89
Mandioca Bruto	3,59	24	1,32	11,75	0,49	1,15
Mandioca desintoxicado	3,66	10	1,19	15,20	1,52	0,98

Durante as 24 horas de fermentação a maior produtividade do meio contendo o hidrolisado de sabugo de milho bruto foi de $0,675 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ avaliada em 14 h de fermentação. Para o meio contendo o hidrolisado desintoxicado a produtividade em 10 h de fermentação foi de $0,78 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

A maior produtividade do meio contendo o hidrolisado de sisal bruto foi em 10 h de fermentação de $1,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Para o meio contendo o hidrolisado desintoxicado foi de $0,54 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 18 h de fermentação.

No meio contendo o hidrolisado de mandioca bruto a produtividade foi de $1,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 10 h de fermentação. Para hidrolisado desintoxicado foi de $1,52 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 10 h de fermentação.

Os resultados de ART mostram o consumo eficiente das leveduras pelos açúcares presentes no meio, principalmente, nos meios contendo os hidrolisados brutos e desintoxicados dos resíduos de sisal e mandioca.

6. CONCLUSÕES

O consórcio das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 foi capaz de utilizar os hidrolisados dos substratos estudados (sabugo de milho, folhas de sisal e resíduos de mandioca), uma vez que, apresentaram desenvolvimento celular e produção de etanol. No sabugo de milho produziram 12,40 g.L⁻¹ de etanol, no hidrolisado de sisal foram 10,50 g.L⁻¹ e nos resíduos de mandioca 15,20 g.L⁻¹ de etanol.

Estes resultados indicam que houve adaptação das leveduras aos três diferentes meios contendo os hidrolisados dos resíduos e podem ser utilizados como meios para produção de etanol 2G.

No estudo da hidrólise ácida dos resíduos de sabugo de milho, folhas de sisal e resíduos de mandioca as melhores condições foram 2,5% de ácido sulfúrico e 15 min. de aquecimento em autoclave (121 °C/ 1.1 atm.). A partir destes parâmetros foi possível selecionar as condições de fermentação a que foram submetidos estes substratos.

O hidrolisado de sabugo de milho resultou em 39,99 g.L⁻¹ de açúcares totais, 35,57 g.L⁻¹ de açúcares redutores e 1,77 g de compostos fenólicos. Para o hidrolisado das folhas de sisal proporcionaram 12,90 e 9,04 g.L⁻¹ de açúcares totais e redutores e 1,65 g de compostos fenólicos. Os resíduos de mandioca promoveram a formação de 66,91 e 48,43 g.L⁻¹ de açúcares totais e redutores e 0,27 g de compostos fenólicos.

O processo de desintoxicação permitiu a redução de 50 a 70% do teor de compostos fenólicos.

Os resíduos estudados mostraram ser uma boa alternativa para a produção de etanol 2G.

7. REFERÊNCIAS

- ABMILHO – Associação Brasileira das Indústrias do Milho. 2020. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br> Acesso em: 12 ago 2020.
- ACS – American Chemical Society. Lignin Structure. 2020. Disponível em: <https://www.acs.org/content/acs/en.html> Acesso em: 06 ago 2020.
- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeasts, *Pichia stipitis*. **Biotechnol Lett**, v. 30, n. 9, p. 1515. 2008.
- AGRAWAL, N. et al. Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 332, p. 125042. 2021.
- ARUMUGAM, N.; ANANDAKUMAR, S. Mini review on Corncob biomass: A potential resource for value-added metabolites. *European Journal of Experimental Biology*. 6(5): 9-13 2016. BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, 26, v. 26, p. 89–105, 2008.
- BEZERRA, Gustavo Santos. Avaliação da produção simultânea de xilitol e etanol a partir do bagaço de sisal, 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.
- BHATIA, S. K. et al. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource Technology**, v. 300, p. 122724. 2020.
- CGEE. Second-generation sugarcane bioenergy e biochemicals: Advanced low-carbon fuels for transport and industry. Brasília: Center for Strategic Studies and Management, 2017.
- CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. **Journal Food Chemistry and Toxicology**, v. 69, p. 67-72, 2004.
- CHAPARRO-GARNICA, J. et al. Biomass waste conversion into low-cost carbon-based materials for supercapacitors: a sustainable approach for the energy scenario. **J. Electroanal. Chem.**, p. 880. 2021. DOI: 10.1016/j.jelechem.2020.114899
- CONVERTI et al. Efeito da temperatura no metabolismo microaerofílico de *Pachysolen tannophilus*, **Enzyme Microb. Technol.**, 28, pp. 339-345. 2001.
- CORREIA, Igor A.; SCANDELAI, Ana Paula J.; SILVA, Nadine C. B.; SOUZA, Alexandre T. de S. Caracterização da manipueira e possibilidades de tratamento. **Colloquium Exactarum**, v. 10, p. 180-185, 2018.

- DA CUNHA-PEREIRA, L. R.; HICKERT, N. T.; SENHEM, C. A. ROSA, P. B. SOUZA-CRUZ, M. A. Z. Ayub, Conversion of sugars present in Rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technol.** 102. 2011. 4218-4225.
- DAMASCENO, M. C. et al. A importância da Lignina para a Produção de Etanol de Segunda Geração. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010.
- DEBNATH M, PANDEY M, SHARMA R, THAKUR GS, LAL P. Intervenção biotecnológica da Agave sisalana: uma planta única de produção de fibras com propriedade medicinal. **J Med Plants Res**, v. 43, p. 177-187. 2010.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- EL-ZAWAWY, W. K., IBRAHIM, M. M., ABDEL-FATTAH, Y. R., SOLIMAN, N. A., MAHMOUD, M. M. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydr. Polym.**, v. 84, p. 865–871, 2011.
- EPA – Environmental Protection Agency. Overview of Greenhouse Gases. 2020. Disponível em: <https://www.epa.gov/ghgemissions/overview-greenhouse-gases>
- ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Análise dos parâmetros cinéticos para produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando fermentação submersa. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-41, 2009.
- FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Market and Policy Analysis of Raw Materials, Horticulture and Tropical (RAMHOT) Products Team Trade and Markets Division. 2019.
- FIESP – Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. Safra Mundial de Milho. 2020. Disponível em: <https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2> Acesso em: 10 nov. 2020.
- GANCEDO, J. M. et al. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p.334-361. 1998.
- GOLDEMBERG, J. Atualidade e perspectivas no uso de biomassa para a geração de energia. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 15-28, 2017.
- GRANBIO. Produção de Etanol 2G. Alagoas, Brasil. 2020. Disponível em: <http://www.granbio.com.br/> Acesso em: 09 out. 2020.
- HAHN-HAGERDAL, B. et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation yeast. **Enzyme Microbiol. Technol.**, 1994, v. 16, p.933-943. 1994.
- HAROUN, B. M.; NAKHLA, G.; HAFEZ, H.; NASR. F. A. Impact of furfural on biohydrogen production from glucose and xylose in continuous-flow systems. **Renew. Energy**, n. 93, p. 302-311. 2016.

- ISHIKAWA, H.; NOBAYASHI, H.; TANAKA, H. Mechanism of fermentation performance of *Zymomonas mobilis* under oxygen supply in batch culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 70, n. 1, p. 34-40. 1990.
- JIANG, Y.; WU, R.; ZHOU, J. et al. Recent advances of biofuels and biochemicals production from sustainable resources using co-cultivation systems. **Biotechnol Biofuels**, v. 12, p. 155. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1495-7>
- JÖNSSON, L. et al. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2013.
- JÖNSSON, L. MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103-112. 2016.
- KIM, S. R.; PARK, Y. C.; JIN, Y. S.; SEO, J. H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnology Advances**, v.31, p.851-861, 2013.
- KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 776-783. 1993. DOI: 10.1007/BF00167144
- KASCHUK, J. J.; LACERDA, T. M.; COMA, V. et al. Enzymatic hydrolysis of mercerized and unmercerized sisal pulp. **Cellulose**, v. 24, p. 2437-2453. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1284-z>
- KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresour. Bioprocess**, v.4, n.7, 2017.
- LAVOVÁ, B.; URMINSKÁ, D.; SILLEROVÁ, S. Diauxic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, n. 1, p. 122-123, 2014.
- LEE, S. C.; PARK, S. Removal of furan and phenolic compounds from simulated biomass hydrolysates by batch adsorption and continuous fixed-bed column adsorption methods **Bioresour. Technol.**, v. 216, p. 661. 2016.
- LI, X.; CHEN, Y.; NIELSEN, J. Harnessing xylose pathways for biofuels production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 57, p. 56-65. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.01.006>
- LI, X.; XU, R.; YANG, J.; NIE, S.; LIU, D.; LIU, Y.; SI, C. Production of 5-hydroxymethylfurfural and levulinic acid from lignocellulosic biomass and catalytic upgradation. **Industrial Crops & Products**, 2019, v. 130, p. 184–197.
- LIGTHELM, M. E. et al. The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 63-38. 1988.
- LIU, X., JENSEN, P. R., WORKMAN, M. Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 559-586, 2012.

- LOOW, Y. L. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. **Cellulose**, v. 23, p. 1491-1520. 2016.
- LORENCI WOICIECHOWSKI, A. et al. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. **Bioresource Technology**, v. 304. 2020.
- LOUREIRO, A. C. et al. Avaliação do potencial dos resíduos (casca, entrecasca e pontas) do beneficiamento da mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) para a produção de bioetanol utilizando hidrólise ácida. **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 2. 2020.
- MA, L. et al. Optimization and evaluation of alkaline potassium permanganate pretreatment of corncob. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 1-6. 2015.
- MARTÍN, S. G.; ARKOWITZ, R. A. Cell polarization in budding and fission yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 2, p. 228-253. 2014.
- MEDEIROS, L. L. et al. Structural-chemical characterization and potential of sisal bagasse for the production of polyols of industrial interest. **Braz. Jour. Chem. Eng.** 37, 451-461. 2020.
- MELO, I. R.; LOPES, C. E.; CATAZANS, G. M. T. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 45–51. 2007.
- MENDES, C. V. et al. Integrated bioconversion of pulp and paper primary sludge to second generation bioethanol using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602. **Bioresource Technology**, v. 220, n. 1, p. 161-167, 2016.
- MONLAU, F. et al. Pyrochars from bioenergy residue as novel bio-adsorbents for lignocellulosic hydrolysate detoxification. **Bioresour. Technol.**, v. 187, p. 379-386. 2015.
- MOYSÉS, D. N.; REIS, V. C. B.; ALMEIDA, J. R. M. D.; MORAES, L. M. P. D.; TORRES, F. A. G. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 207. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17030207>
- MUÑOZ-PÁEZ et al. Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation hydrogen production and microbial structure of a mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 4, p. 2289-2297, 2019.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production-R1. **Biotechnonology advances**, v. 28, n. 6, p. 817-830, 2010.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004.

NAGHSHBANDI, M. P. Progress toward improving ethanol production through decreased glycerol generation in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic and genetic engineering approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115. 2019.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. **Biochemistry**, v. 153, n. 2, p. 375–380, 1944.

NGUYEN et al. A new approach for concurrently improving performance of South Korean food waste valorization and renewable energy recovery via dry anaerobic digestion under mesophilic and thermophilic conditions. **Wast Management**, v. 66, 161-168. 2017.

NUGROHO, R. H.; YOSHIKAWA, K.; SHIMIZU, H. Metabolomic analysis of acid stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng**, v. 120, n. 4, p. 396-404, 2015.

OLIVEIRA, R. A. et al. Detoxification of sugarcane-derived hemicellulosic hydrolysate using a lactic acid producing strain. **Journal of Biotechnology**, v. 278, p. 56. 2018.

OTEKUNRIN, O. A., & SAWICKA, B. Cassava, A 21 st Century Staple Crop: How can Nigeria Harness its Enormous Trade Potentials? **Acta Scientific Agriculture**, v. 3, n. 8, p. 194–202. 2019.

PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J.; HAHN-HÄGERDAL, B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 62, n. 4, p. 447-454, 1999.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PELISSARI, F. M.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from banana peels. **Cellulose**, n. 21, p. 417. 2014.

POLACHINI, T. C. et al. **Composição química de biomassa lignocelulósica de bagaço de mandioca e de casca de mandioca: influência da distribuição do tamanho de partícula.** Avanços das Pesquisas e Inovações na Engenharia Química. 1ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020, v. 1, p. 196-208.

QUEIROGA, V. P. et al. Sisal (*Agave sisalana*, Perrine); Tecnologias de plantio e utilização. Campina Grande: AREPB, p. 2017. 2021.

RABEMANOLONTSOA, S.; SAKA, H. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 83-91, 2016.

RAÍZEN. Relatório anual 2018/2019. Disponível em:

<<https://www.raizen.com.br/sustentabilidade/transparencia#relatorio-anual> > Acesso em: 06 de out. de 2020.

RAMOS, R. R. F. Desenvolvimento de compósitos de polipropileno (PP) com sabugo de milho (SM) provenientes de resíduos agrícolas. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal da Paraíba, 2013.

RFA – Renewable Fuels Association. Ethanol. Disponível em: < <https://ethanolrfa.org/about> > Acesso em: 20 set. 2020.

RIBEIRO, G. O.; GRUNINGER, R. J.; BADHAN, A.; McALLISTER, T. A. Mining the rumen for fibrolytic feed enzymes. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 2, p. 20-26, 2016.

ROCHA, M. S. R. S.; SILVA, M. C. S.; PIMENTEL, W. R. O.; ALMEIDA, R. M. R. G. Pré-tratamento ácido dos resíduos de milho para produção de etanol de segunda geração. **Engevista**, v. 18, n. 2, p. 412-423, 2016.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, 912, 249-257. 2001.

RUCHALA, J. et al. Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*), **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 109–132. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02242-x>

SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Elmsford, v. 89, n. 3, p. 246-291, 2005.

SANTANA, J. C.; DA SILVA, A. C. M.; ABUD, A. K.; WISNIEWSKI JR, A.; ROMAO, L. P. C. Pretreatment and enzymatic saccharification of water hyacinth, sugarcane bagasse, maize straw, and green coconut shell using an Organosolv method with glycerol and FeCl₃. J. **Braz. Chem. Soc.**, 2022. DOI: 10.21577/0103-5053.20220032.

SANTOS, J. R. A. et al. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4. 2010.

SANTOS, R. M. S. R. et al. Pré-tratamento hidrotérmico de resíduos do milho visando à produção de etanol de segunda geração. **Scientia Plena**, v. 13, n.3, 2017.

SEDLAK, M.; HO, N. W. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. **Yeast**, v. 21, p. 671–684. 2004.

SILVA, M. D. et al. Acid Hydrolysis of corn cob for the production of second-generation ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602. **International Journal of Development Research**, v. 10, n. 8, p. 38871-38878. 2020.

SINGH, B. et al. A biotechnological approach for degradation of inhibitory compounds present in lignocellulosic biomass hydrolysate liquor using *Bordetella* sp. BTIITR. **Chem. Eng. J.**, v. 328. 2017.

SIVAGURUNATHAN, P. et al. 2G waste lignin to fuel and high value-added chemicals: Approaches, challenges and future outlook for sustainable development. **Chemosphere**, v. 268, p. 129326. 2021. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129326

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 19–23, 1952.

SONG B. et al. Recent advances and challenges of inter-disciplinary biomass valorization by integrating hydrothermal and biological techniques. **Renew. Sustain. Energy Rev.**, 135 (2021), 10.1016/j.rser.2020.110370 110370

STATSOFT INC. Statistica for windows. Tulsa: STATSOFT, 1996.

STEPANOV, N.; EFREMENKO, E. Immobilized cells of *Pachysolen tannophilus* yeast for ethanol production from crude glycerol. **New Biotechnology**, v. 34, p. 54. 2017.

STULKE, J.; HILLEN, W. Carbon catabolite repression in bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, p. 195-201. 1999.

TAHERZADEH M. J. et al. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 701-708. 2000.

TANG, W. Natural surfactant-aided dilute sulfuric acid pretreatment of waste wheat straw to enhance enzymatic hydrolysis efficiency. **Bioresour. Technol.**, v. 324, p. 124651. 2021. 10.1016/j.biortech.2020.124651

TIAN, S.; ZHOU, G.; YAH, F.; YU, Y.; YANGO, X. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. **Biotechnology Advances**. 27, 656-60. 2009.

TIBOLLA, H.; PELISSARI, F. M.; RODRIGUES, M. I.; MENEGALLIA, F. C.; Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and mechanical treatments: characterization and cytotoxicity assessment. **Food Hydrocolloids**. v. 75, n. 192. 2017.

TOOGOOD, H. S.; SCRUTTON, N. S. Discovery, characterization, engineering, and applications of ene-reductases for industrial biocatalysis. **ACS Catal**. 2018. DOI: 10.1021/acscatal.8b00624

TRAKARNPAIBOON, S.; SRISUK, N.; PIYACHOMKWAN, K.; YANG, S.;KITPREECHAVANICH, V. L-lactic acid production from liquefied cassava starch by thermotolerant *Rhizopus microsporus*: characterization and optimization. **Process Biochem.**, v. 63, p. 26-34. 2017. 0.1016/j.procbio.2017.08.019

- TRINCA, N. R. R.; BRUNATTI, A. C. S.; GARCIA-CRUZ, C. H. The influence of the presence of phenolic compounds in culture medium containing acid hydrolysate of soybean hulls as substrate to produce ethanol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, p. 11, 2017.
- VALLEJOS, M. E.; KRUYENISKI, J.; AREA, M. C. Second-generation bioethanol from industrial wood waste of South American species. **Biofuel Research J.** 15:654-667. 2017.
- VAN AALST, A. C. A.; DE VALK, S. C.; VAN GULIK, W. M.; JANSEN, M. L. A.; PRONK, J. T; MANS, R. Pathway engineering strategies for improved product yield in yeast-based industrial ethanol production. **Synth Syst Biotechnol.**, v. 7, p. 554. 2022.
- WANG, G. et al. One-pot lignin depolymerization and activation by solid acid catalytic phenolation for lightweight phenolic foam preparation. **Industrial Crops and Products**, v. 124, n. 15, p. 216-225. 2018.
- WANG, X. et al. Metabolomic analysis reveals key metabolites related to the rapid adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple inhibitors of furfural, acetic acid, and phenol. **OMICS.**, v. 17, n. 3, p. 150-159, 2013.
- WANG, X., TSANG, Y.F., LI, Y., MA, X., CUI, S., ZHANG, T.-A.A., HU, J., GAO, M.-T.T. Inhibitory effects of phenolic compounds of rice straw formed by saccharification during ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 244, n 1, 1059-1067. 2017.
- YAHYA, M.; CHEN Y. W.; LEE, H. V.; HASSAN, W. H. W. Reuse of Selected Lignocellulosic and Processed Biomasses as Sustainable Sources for the Fabrication of Nanocellulose via Ni(II)-Catalyzed Hydrolysis Approach: A Comparative Study. **Journal of Polymers and the Environment**, n. 26, p. 285. 2018.
- YANG, Y. et al. Features correlated to improved enzymatic digestibility of corn stover subjected to alkaline hydrogen peroxide pretreatment. **Bioresour. Technol.**, v. 325, p. 124688. 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.124688
- ZABED, H. et al. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, 475-501. 2017.
- ZHANG, M. et al. Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: Current status and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 215, n. 1, p. 50-62, 2016.
- ZHANG, Y.; XIA, C.; LU, M.; TU, M.; Effect of overliming and activated carbon detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 178. 2018. DOI:10.1186/s13068-018-1182-0
- ZHOU, Z.; LIU, D.; ZHAO, X. Conversion of lignocellulose to biofuels and chemicals via sugar platform: An updated review on chemistry and mechanisms of acid hydrolysis of lignocelluloses. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 146. 2021.

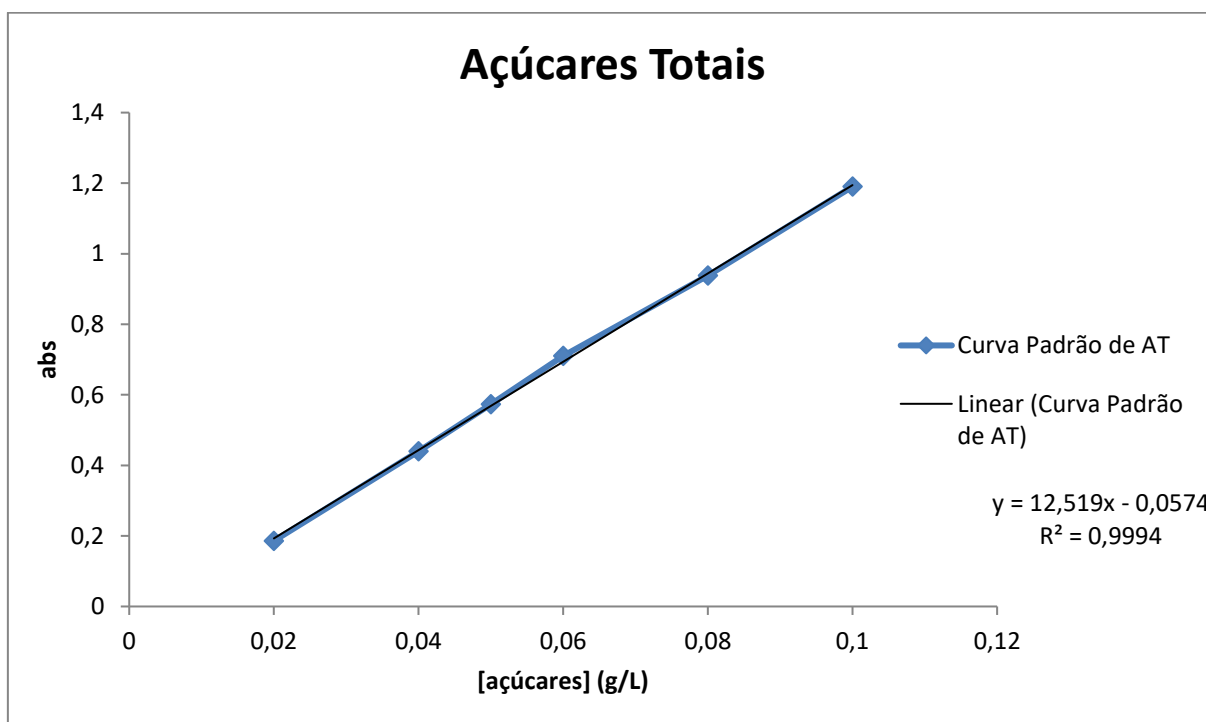
8. ANEXOS

8.1 CURVA PADRÃO DE GLICOSE PARA AÇÚCARES TOTAIS

Tabela 18 – Concentrações de glicose (g/L) e absorvâncias obtidas na construção da curva padrão para quantificação de açúcares totais.

[glicose] (g/L)	Absorvância (nm)
0.02	0.186
0.04	0.440
0.05	0.573
0.06	0.710
0.08	0.938

Figura 35 – Curva padrão de glicose para açúcares totais.

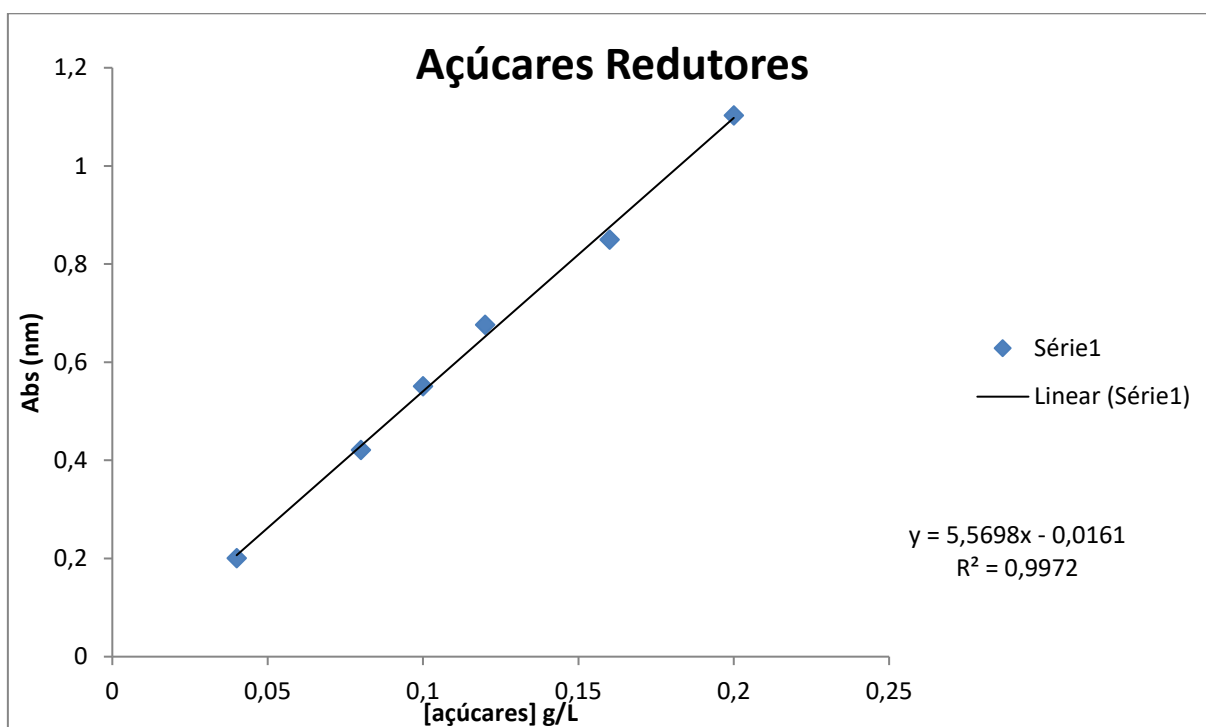


8.2 CURVA PADRÃO DE GLICOSE PARA AÇÚCARES REDUTORES

Tabela 19 – Concentrações de glicose (g/L) e absorvâncias determinadas na obtenção da curva padrão de glicose para açúcares redutores.

[glicose] (g/L)	Absorbância (nm)
0,04	0,201
0,08	0,421
0,10	0,551
0,12	0,676
0,16	0,850
0,20	1,103

Figura 36 – Curva padrão de glicose para açúcares redutores.

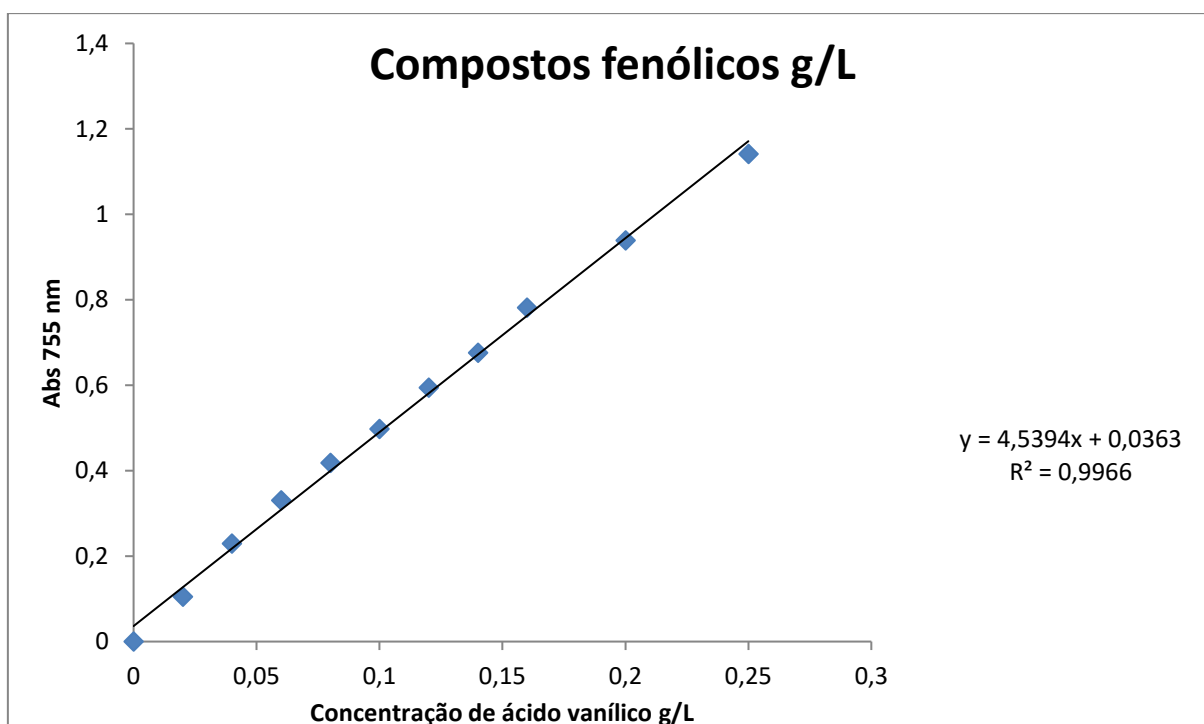


8.3 CURVA PADRÃO DE ÁCIDO VANÍLICO PARA COMPOSTOS FENÓLICOS

Tabela 20 – Concentrações de ácido vanílico (g/L) e absorvâncias determinadas na obtenção da curva padrão de ácido vanílico para determinação de compostos fenólicos.

Concentração (g/L)	Abs. (nm)
0	0
0,02	0,105
0,04	0,229
0,06	0,330
0,08	0,418
0,10	0,497
0,12	0,594
0,14	0,676
0,16	0,781
0,20	0,939
0,25	1,141

Figura 37 – Curva padrão de ácido vanílico para cálculo do teor de compostos fenólicos.

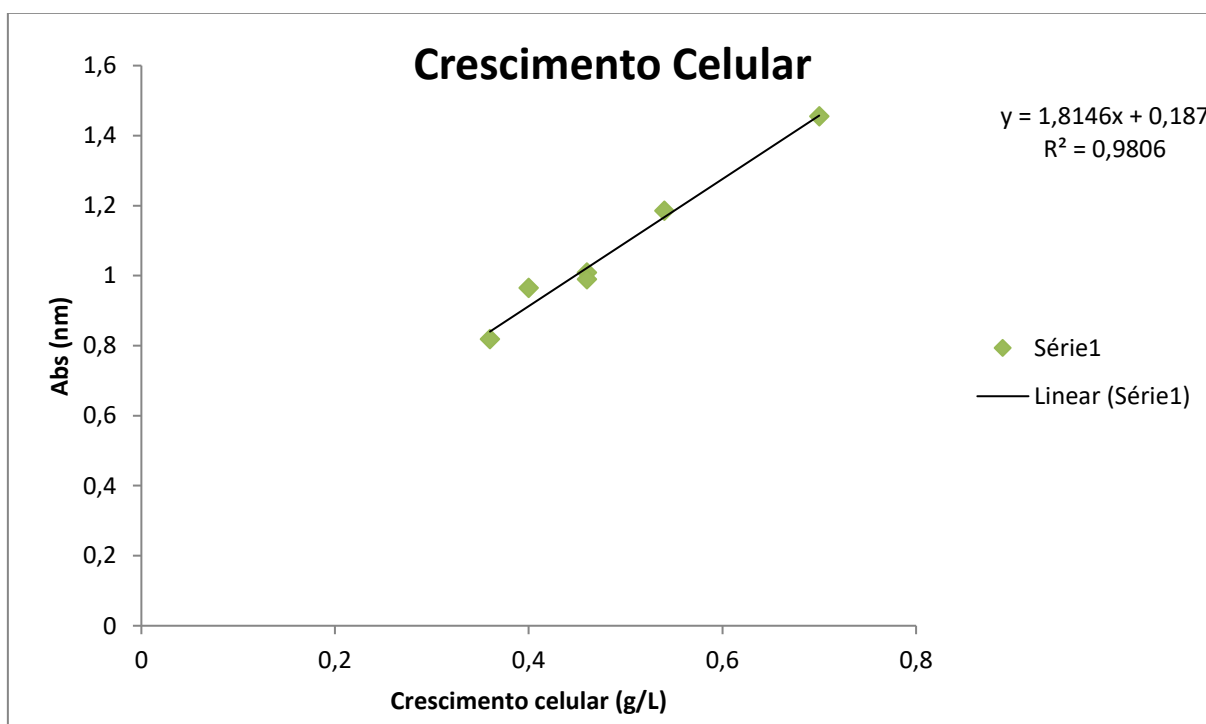


8.4 CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR PARA A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Tabela 21 – Peso celular da levedura (g/L) e absorvâncias determinadas na obtenção da curva do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Peso celular (g/L)	Abs. (nm)
0,36	0,818
0,4	0,965
0,46	1,009
0,46	0,989
0,54	1,185
0,7	1,455
0,76	1,457
1,12	1,793
1,38	1,982
2,82	2,52

Figura 38 – Curva padrão de glicose para crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*.



8.5 CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR PARA A LEVEDURA *PACHYSOLEN TANNOPHILUS*

Tabela 22 – Peso celular da levedura (g/L) e absorbâncias determinadas na obtenção da curva do crescimento de *Pachysolen tannophilus*.

Peso celular (g/L)	Abs. (nm)
0.050	0.182
0.010	0.210
0.050	0.254
0.160	0.285
0.020	0.321
0.070	0.403
0.160	0.490
3.030	2.431

Figura 39 – Curva padrão de crescimento da *Pachysolen tannophilus*.

