



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

CAMILA CALDERAN BEBBER

GUILHERME AUGUSTO DE SOUZA PEREIRA

LEONARDO HENRIQUE ROTTA

NICOLE BRENA MARQUES SOARES

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE
HIDROLISADO DE SABUGO DE MILHO PARA APLICAÇÃO EM ÁLCOOL EM
GEL**

Araraquara, SP

2024

CAMILA CALDERAN BEBBER
GUILHERME AUGUSTO DE SOUZA PEREIRA
LEONARDO HENRIQUE ROTTA
NICOLE BRENA MARQUES SOARES

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE
HIDROLISADO DE SABUGO DE MILHO PARA APLICAÇÃO EM ÁLCOOL EM
GEL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Araraquara, SP
2024

P964

Produção de bioetanol de segunda geração a partir de hidrolisado de sabugo de milho para aplicação em álcool em gel / Camila Calderan Beber... [et al.]. - Araraquara, 2024.
84 f. : il.

Orientador: Fernando Masarin.

Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Bioetanol. 2. Hidrolisado. 3. Sabugo de milho. I. Beber, Camila Calderan. II. Pereira, Guilherme Augusto de Souza. III. Rotta, Leonardo Henrique. IV. Soares, Nicole Brena Marques V. Masarin, Fernando, orient. VI. Título

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

Esta ficha não pode ser modificada

AGRADECIMENTOS

Nicole: gostaria de agradecer à minha mãe, Érica Cristiane Marques e aos meus avós, José Vicente Marques e Nadir Marques, além do meu padrasto Alan Steves Nogueira pelo apoio, carinho e incentivo que sempre me deram e pelo investimento que fizeram em minha educação. Sem isso, não teria chegado até aqui, ao meu companheiro, Gabriel Toshio Tamagawa Miranda por todo o suporte durante a execução deste trabalho e pelas palavras incentivadoras de sempre. Também agradeço à República Rep Hour, que me acompanhou durante esses 5 anos, me dando forças, me motivando e colocando amigas incríveis na minha vida. Faço um agradecimento especial às minhas amigas de infância Maria Eduarda Campos, Jullia Ribeiro, Laís Tuckumantel, Anna Laura Volpini, Larissa Lelis e Giulia Basana por serem meu porto seguro desde sempre. E por fim agradeço ao meu grupo de TCC por toda parceria durante esse semestre de execução do trabalho e por deixar esse momento mais leve.

Camila: Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Fernando e Glauca, que não mediram esforços para apoiar e incentivar meus estudos ao longo de todos esses anos. À minha família e amigos por estarem sempre presentes, mesmo de longe, dando suporte e apoiando minhas conquistas. Agradeço à turma 08 pela parceria nos estudos e além deles. Foi uma experiência maravilhosa conviver com eles ao longo desses anos. Também agradeço meu grupo de TCC por toda colaboração, paciência, aprendizado e companheirismo ao longo desse último semestre.

Leonardo: Agradeço inicialmente a minha família, pais, avós, irmão e irmã e todos os outros, pois não estaria aqui sem vocês em diferentes situações. Agradeço a todos meus amigos que estiveram comigo até hoje e aos que fiz durante a graduação, obrigado por estar e compartilhar a vida comigo. Agradeço também a minha família araraquarense do apartamento 71 por todo apoio durante a graduação, inclusive em momentos críticos, vocês sempre serão lembrados por mim, obrigado por serem um porto seguro nas tempestades. Agradeço à minha orientadora de Iniciação Científica e ao meu grupo de pesquisa que acenderam minha paixão pela pesquisa, colorantes e fungos, sou muito grato pelo acolhimento e carinho que compartilhamos.

Agradeço à Turma 08 (e agregados) de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia por toda parceria nos estudos, vôlei e diversos desde 2020. Agradeço também ao meu grupo de TCC de sabugo, principalmente pela paciência, compreensão e amizade que desenvolvemos, obrigado por estarem comigo e toparem todo o trabalho extra. Todos vocês são demais e partes insubstituíveis da minha vida.

Guilherme: Dedico meu agradecimento primeiramente aos meus pais, Cynara e Wagner, que muito fizeram para que meu desenvolvimento fosse completo, investir na educação e acreditar em mim a cada passo, agradeço também a minha avó Jandira, por todas as preces e preocupações. Gostaria de agradecer a família e amigos por todos os momentos de diversão, acolhimento e ensinamentos, agradeço a turma 08 do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia que fizeram a experiência da graduação engrandecedora e fantástica, poder me desenvolver do lado de pessoas incríveis foi no mínimo inspirador e muito prazeroso. Um agradecimento especial a minha parceira Giulia Evelin, que me ensinou a ver as cores do mundo novamente, trouxe o sonhador de volta, me inspira e me apoia em momentos difíceis, na corrida ou na caminhada. E claro, não poderia deixar de agradecer minha família do laboratório, que desbravou esse tema de TCC ao meu lado, obrigado pela paciência, aprendizado e amizade durante esse período, desejo todo sucesso do mundo a vocês, conquistem tudo, porque eu sei que são capazes.

Agradecemos aos técnicos e professores que contribuíram significativamente para o desenvolvimento deste projeto, cuja assistência e suporte foram fundamentais ao longo do processo. E também somos gratos aos nossos colegas de sala, que caminharam conosco nesse caminho, que dividiram momentos difíceis como a pandemia e também momentos de alegria.

RESUMO

O bioetanol de segunda geração (2G) é produzido pela fermentação de açúcares liberados em resíduos agrícolas e florestais, através do metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Linhagens como a PE-2 destacam-se por sua alta resistência e eficiência na produção de etanol em condições severas. O sabugo de milho, composto majoritariamente por hemicelulose, celulose e lignina, se apresenta como uma opção viável para a produção de bioetanol. Este resíduo agrícola, gerado em grandes quantidades, pode ser transformado em bioetanol em vez de ser descartado ou queimado. Para utilizá-lo como substrato na produção de etanol, é necessário que ele passe por processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática para liberar os açúcares fermentáveis. Dentro do âmbito do conceito apresentado, o objetivo do presente estudo foi produzir etanol de segunda geração a partir do sabugo de milho, submetido a pré-tratamento ácido oxidativo, hidrólise enzimática e fermentação com *S. cerevisiae*, para a formulação de álcool em gel. Assim, foi realizado o crescimento da levedura em meio YEPD (Yeast Extract - Peptone - Dextrose) e a propagação em meios de sacarose para a preparação do inóculo, foi realizado ensaios alterando a concentração de magnésio para observar o seu efeito sobre o cultivo e sua viabilidade, também foi avaliado a possibilidade de um meio sintético que mimetiza o uso do hidrolisado do sabugo de milho, a etapa de purificação foi executada visando extrair etanol com um grau de pureza elevado, para este ser usado no desenvolvimento de uma formulação de álcool em gel. Ademais, foi analisado o potencial de aproveitamento de resíduos, conduzindo o experimento de determinação de sólidos totais, demanda química de oxigênio e quantidade de nitrogênio. A partir disso foi possível obter 75,73% de rendimento mássico do pré-tratamento, ao dobrar a concentração de magnésio foi obtido uma eficiência fermentativa de 98,2%, com o processo de purificação empregado foi alcançado uma pureza de 82° GL. Portanto foi atingido a produção de etanol satisfatória com baixo volume de etanol produzido devido a baixa conversão enzimática de 11,36%.

Palavras-chave: Bioetanol; Hidrolisado; Sabugo de milho.

ABSTRACT

Second generation bioethanol (2G) is produced by the fermentation of sugars released in agricultural and forestry residues, through the metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Lines such as PE-2 stand out for their high resistance and efficiency in ethanol production under severe conditions. Corn cob, composed mainly of hemicellulose, cellulose and lignin, presents itself as a viable option for the production of bioethanol. This agricultural waste, generated in large quantities, can be transformed into bioethanol instead of being discarded or burned. To use it as a substrate in the production of ethanol, it must go through pre-treatment and enzymatic hydrolysis processes to release fermentable sugars. Within the scope of the presented concept, the objective of the present study was to produce second generation ethanol from corn cobs, subjected to oxidative acid pre-treatment, enzymatic hydrolysis and fermentation with *S. cerevisiae*, for the formulation of alcohol gel. Thus, the yeast was grown in YEPD (Yeast Extract - Peptone - Dextrose) medium and propagated in sucrose media to prepare the inoculum. Tests were carried out changing the magnesium concentration to observe its effect on the cultivation and its viability, the possibility of a synthetic medium that mimics the use of corncob hydrolyzate was also evaluated. The purification step was carried out to extract ethanol with a high degree of purity, for it to be used in the development of an alcohol formulation in gel. Furthermore, the potential for using waste was analyzed, conducting the experiment to determine total solids, chemical oxygen demand and quantity of nitrogen. From this it was possible to obtain 75.73% mass yield from pre-treatment, by doubling the magnesium concentration a fermentative efficiency of 98.2% was obtained, with the purification process used a purity of 82 GL was achieved. Therefore, satisfactory ethanol production was achieved with a low volume of ethanol produced due to low enzymatic conversion of 11.36%.

Keywords: Bioethanol; Hydrolyzed; Corn cob.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas que compõem os materiais lignocelulósicos.....	20
Figura 2 – Ilustração do efeito que o pré-tratamento tem sobre os resíduos lignocelulósicos.....	22
Figura 3 – Ação catalítica do complexo enzimático das celulasas na celulose, gerando glicose.....	27
Figura 4 – Ajuste do pH do meio de propagação.....	33
Figura 5 – Erlenmeyer de 500mL destinado a expansão da levedura.....	34
Figura 6 – Representação esquemática da Câmara de Neubauer.....	35
Figura 7 – Tubos tipo Falcon P50 contendo glicerol 30% e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sedimentada.....	36
Figura 8 – Sabugo de milho moído em moinho de facas e liquidificador.....	36
Figura 9 – Sistema montado para realização da hidrólise enzimática.....	38
Figura 10 – Biorreator e Controlador New Brunswick.....	41
Figura 11 – Sistema de destilação do etanol.....	42
Figura 12 – Equipamento de destilação por arraste utilizado para o método de kjeldahl.....	47
Figura 13 – Fotografia tirada ao final das 72h da etapa de hidrólise.....	51
Figura 14 – Álcool em gel produzido com o etanol proveniente da destilação.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Técnicas de pré-tratamento de resíduos lignocelulósicas para produção de etanol 2G.....	22
Tabela 2 – Teor de umidade encontrado para as amostras de sabugo.....	48
Tabela 3 – Valor inicial e final do pré-tratamento com o valor calculado de rendimento.....	49
Tabela 4 - Valores encontrados para os Açúcares Redutores Totais (ART).....	50
Tabela 5 – Valor inicial e final do pré-tratamento com o valor calculado de rendimento.....	51
Tabela 6 – Eficiência de conversão para as diferenças de magnésio em cada cultura.....	53
Tabela 7 – Viabilidade média em cada concentração de magnésio ao final do ensaio.....	54
Tabela 8 – Eficiência de conversão para os diferentes meios de fermentação.....	58
Tabela 9 – Viabilidade média nos diferentes meios de fermentação.....	58
Tabela 10 – Eficiência de conversão para os diferentes meios de fermentação.....	61
Tabela 11 – Eficiência de conversão em etanol realizada no biorreator.....	62
Tabela 12 – Volumes iniciais e finais das destilações dos meios de fermentação...	63
Tabela 13 – Resultados das análises realizadas em relação a sólidos, demanda química de oxigênio e concentração de proteínas.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva Analítica de DQO em solução de hidrogenoftalato de potássio	45
Gráfico 2 – Representação da esquerda para direita da produção de etanol, consumo de glicose e consumo de frutose.....	52
Gráfico 3 – Crescimento celular durante o período de fermentação.....	53
Gráfico 4 – Representação da esquerda para direita da produção de etanol, consumo de glicose e consumo de frutose.....	55
Gráfico 5 – Representação esquemática da produção de subprodutos e consumo de xilose.....	56
Gráfico 6 – Representação da variação da concentração de ácido succínico durante a fermentação.....	55
Gráfico 7 – Representação da esquerda para direita da produção de etanol, consumo de glicose e consumo de xilose.....	59
Gráfico 8 – Representação, da esquerda para a direita, variação na concentração de glicerol, variação na concentração de ácido acético, produção de ácido succínico.....	59
Gráfico 9 – Representação dos subprodutos formados durante a fermentação em decorrência dos açúcares consumidos.....	62
Gráfico 10 – Concentração de etanol após a destilação nos diferentes meios de fermentação.....	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Etanol de segunda geração.....	15
2.2. Fermentação.....	16
2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.4. Sabugo de milho.....	19
2.5. Pré-tratamento de Resíduos Lignocelulósicos.....	20
2.5.1. Pré-tratamento Físico.....	23
2.5.2. Pré-tratamento Químico.....	23
2.5.3. Pré-tratamento biológico.....	25
2.5.4. Pré-tratamento Combinado (Físico-químico).....	25
2.6. Hidrólise.....	26
2.6.1. Hidrólise enzimática.....	26
2.7. Inibidores da fermentação alcoólica.....	28
2.7.1. Temperatura.....	28
2.7.2. Concentração de etanol.....	28
2.7.3. Influência do magnésio no metabolismo da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.8. Álcool em gel.....	29
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Preparo do inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 em Erlenmeyer.....	32
4.1.1. Preparo dos meios de cultivo e fermentação.....	32
4.2. Expansão do levedo.....	34
4.3. Determinação da viabilidade celular do levedo.....	35
4.4. Armazenamento da levedura.....	35
4.5. Pré tratamento do sabugo de milho.....	36
4.5.1. Determinação do teor de umidade do sabugo de milho.....	36
4.5.2. Pré-tratamento ácido do sabugo de milho.....	37
4.6. Hidrólise enzimática do sabugo de milho.....	38
4.7. Ensaio de fermentação alcoólica para produção do etanol 2G.....	39
4.7.1. Ensaios Fermentação - Erlenmeyer - Hidrolisado.....	39
4.7.2. Ensaios de efeito de magnésio a cultura de <i>S. cerevisiae</i>	40
4.8. Condução dos ensaios de fermentação etanólica com inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 em Biorreator.....	40
4.9. Purificação e Aplicação.....	42
4.10. Tratamento de resíduos gerados.....	43
4.10.1. Determinação de sólidos.....	44
4.10.2. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	45
4.10.3. Determinação de nitrogênio sólidos pelo método de Kjeldahl.....	46

4.10.4. Determinação de proteínas em soluções pelo método de Bradford.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1. Pré-tratamento ácido.....	48
5.1.1. Teor de umidade do sabugo de milho.....	48
5.1.2. Rendimento mássico após Pré-tratamento.....	49
5.3.1. Fermentação utilizando diferentes concentrações de magnésio.....	52
5.3.2. Determinação da produção de etanol em Erlenmeyer com diferentes meios de fermentação.....	54
5.3.3. Avaliação da fermentação em Biorreator.....	61
5.5.1. Resíduos líquidos.....	66
5.5.2. Resíduos sólidos.....	67
5.5.3. Perspectivas e destinos dos resíduos.....	68
6. CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
APÊNDICE I - Fluxograma do processo de produção de etanol de segunda geração a partir do hidrolisado de sabugo de milho.....	84

1. INTRODUÇÃO

Durante a década de 70, o mundo foi marcado pela primeira crise do petróleo, isso fez com que a importância econômica do etanol no Brasil aumentasse (Montiel, 2022). Ademais, essa importância também se deu pelas preocupações econômicas e ambientais, haja visto as altas taxas de emissão de gases do efeito estufa pelos combustíveis fósseis e de como isso traz consequências negativas ao planeta (Müller *et al.*, 2019).

Dessa forma, em 1975 o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) foi criado, visando reduzir a dependência externa sobre combustíveis fósseis e a tornar o etanol competitivo no mercado, para promover uma fonte de energia renovável e para desenvolver a tecnologia nacional, aliada à geração de emprego e renda (Bernardes, 2023). Até 2004, o Brasil era líder na produção de etanol mundial e atualmente ocupa o segundo lugar. O primeiro lugar agora é ocupado pelos Estados Unidos, produzindo etanol a partir do milho e o terceiro lugar pertence à União Europeia, a qual produz etanol por beterraba sacarina (Müller *et al.*, 2019).

Com isso, a tecnologia do etanol de primeira geração já estava bem estabelecida e iniciou-se um debate sobre combustível *versus* alimento, tendo em vista o impacto nos preços causados pela utilização da cana-de-açúcar, colocando a segurança alimentar da população em perigo e também pelas maiores áreas degradadas para zonas de cultivo. Por essas razões, o interesse em biomassas lignocelulósicas residuais, como bagaço de cana e sabugo de milho aumentou (Müller *et al.*, 2019) para a produção de etanol de segunda geração (2G), visto que emite menos gases do efeito estufa que o próprio etanol 1G, não compete com culturas alimentares e reaproveita resíduos, agregando valor nestes (Silva *et al.*, 2022).

O milho é a segunda cultura mais cultivada no Brasil com estimativa de 129,15 milhões de toneladas para a safra 2023/24 (Globo Rural, 2023) e também tem se tornado matéria-prima para a produção de etanol de primeira geração, estando cada vez mais consolidado no cenário sucroenergético brasileiro (Ribeiro, 2023). Essa produção somada aos outros destinos do milho, gera resíduos, como a palha e o sabugo. Estima-se que a produção de 1 kg de espiga gera 0,22 kg de sabugo, pois durante a colheita, as colheitadeiras debulham os grãos e os armazenam, enquanto o sabugo fica como resíduo (Santos Filho, 2021). Esse resíduo tem grande potencial para a produção de etanol de segunda geração, de

acordo com Santos (2014) em geral o sabugo de milho possui 41 % de celulose, 36% de hemicelulose e 6% de lignina. A celulose é o composto de maior interesse visto que após um pré tratamento e hidrólise, é convertida em açúcares fermentescíveis.

Esse material lignocelulósico precisa de um pré-tratamento, podendo este ser ácido, o qual confere vantagens significativas, como altos rendimentos de sacarificação e solubilização eficiente da hemicelulose e da lignina, o tornando flexível e fazendo com que a celulose se torne mais acessível. Alguns desafios são encontrados no pré-tratamento ácido, principalmente aos que o utilizam concentrado, como corrosividade, produção de substâncias inibitórias e alto custo de recuperação (Solarte-Toro *et al.*, 2019; Aghael *et al.*, 2022). Uma gama de diversas técnicas biológicas, físicas e químicas são alternativas também de pré-tratamento. Como forma de resolver a produção destes compostos inibitórios, também foi proposto a utilização de carvão ativado como forma de desintoxicar o hidrolisado e vem apresentando bons resultados nos estudos realizados (Mussato, 2004).

A hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos é catalisada por celulases altamente específicas para a quebra da celulose anteriormente acessível pelo pré-tratamento. Essa abordagem oferece vantagens interessantes ao processo, permitindo altos rendimentos em condições menos rigorosas e com menos impactos ambientais. Apesar da sua eficiência, o custo elevado das enzimas continua sendo um desafio para a implementação em larga escala (Santos, 2014).

Para que a fermentação e então produção do etanol possa acontecer, é necessário inserir no meio o microrganismo responsável pela conversão do açúcar em produto. A *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo com morfologia elipsoidal, amplamente empregado para procedimentos de fermentação, visto que possuem alto potencial de tolerância ao etanol, capacidade de suportar ambientes com baixos valores de pH e uma alta taxa de conversão, ademais, o microrganismo possui uma taxa de crescimento acelerado (dobrando a massa em intervalos de 90 minutos, quando expostos a condições ambientais favoráveis). Dentre as diferentes linhagens existentes da *S. cerevisiae*, há algumas que se destacam e são aplicadas em processos industriais, são elas, a PE-2 e CCUG53310, as quais possuem uma resistência superior e uma eficiência de conversão maior de diversas fontes de glicose, além de apresentar uma resistência a estresse osmótico (Cunha *et al.*, 2015; Cruz, 2021; Gonçalves *et al.*, 2019).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Etanol de segunda geração

A escassez de combustíveis fósseis, o aumento dos preços do petróleo importado e mudanças nas políticas globais estão incentivando os países a buscar alternativas sustentáveis. Desde 2005, diversas nações têm adotado regulamentações para incluir biocombustíveis nos transportes. Atualmente, 98% do combustível usado nos transportes rodoviários vem de fontes fósseis, enquanto 2% são biocombustíveis (IEA, 2019). Dentre os biocombustíveis, o bioetanol é o mais produzido. Em 2018, a produção global de biocombustíveis foi de 154 bilhões de litros, sendo 110 bilhões de bioetanol. Espera-se que a produção de bioetanol aumente 20% até 2024, alcançando 130 bilhões de litros. O bioetanol possui menor densidade de energia em comparação à gasolina, necessitando de maior volume para realizar a mesma quantidade de trabalho, mas sua alta octanagem melhora a eficiência térmica dos motores. Pode ser utilizado como substituto da gasolina e misturado em qualquer proporção, com muitos países permitindo até 10% de etanol na gasolina (E10), enquanto misturas mais altas, como E85 e E100, requerem veículos adaptados (flex-fuel). No Brasil, é usado E27 em todos os veículos e E100 nos veículos flex-fuel (Gandam, 2022).

Em relação a precificação do bioetanol, inicialmente aborda-se a produtividade, sendo que em 2023, a produção de etanol no Brasil cresceu 15,5%, totalizando 35,4 milhões de m³, com aumentos de 13,5% no etanol anidro e 16,8% no hidratado, enquanto a taxa média anual de crescimento entre 2014 e 2023 foi de 2,3%. A Região Sudeste, responsável por 48,5% da produção nacional, liderou com 17,2 milhões de m³, um aumento de 14,2%. As Regiões Nordeste, Sul e Centro-Oeste também cresceram, registrando aumentos de 18,8%, 13,2% e 17,2%, respectivamente, enquanto a Região Norte teve uma queda de 5,4%. São Paulo foi o maior produtor, com 13,7 milhões de m³, seguido por Goiás (5,5 milhões de m³), Mato Grosso (5,4 milhões de m³) e Mato Grosso do Sul (3,8 milhões de m³), todos com crescimentos significativos. Globalmente, os preços do bioetanol devem cair entre 2017 e 2024, acompanhando a tendência dos preços do petróleo, embora não alcancem os mínimos históricos de 1999 e 2002. Em 2015, o custo máximo do biocombustível foi de 66,5 USD/L, coincidindo com o pico dos preços do petróleo

(Zamora-Zamora, 2017; Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2022).

Embora a cana-de-açúcar e o milho sejam fontes importantes para a produção de bioetanol, não são suficientes para substituir a demanda mundial de petróleo, levando à busca por matérias-primas não comestíveis, como resíduos agrícolas, para a produção de bioetanol de segunda geração. Este tipo de biocombustível utiliza resíduos agrícolas e florestais, evitando a competição com alimentos. No entanto, a complexidade da biomassa lignocelulósica e suas variações regionais ainda apresentam desafios econômicos para a produção em larga escala. Resíduos como palha de milho, bagaço de cana e palha de trigo são promissores. A produção de bioetanol pode seguir a rota bioquímica (BC), envolvendo pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação, ou a rota termoquímica (TC), que transforma biomassa em biocombustíveis através do uso de calor. O desempenho varia conforme o tipo de biomassa: a biomassa herbácea é adequada para BC, apresentando um preço mínimo de venda (MESP) mais alto; a biomassa de madeira macia é melhor para TC, com menor MESP, mas maiores emissões; e a biomassa de madeira dura é ideal para BC, com alta produtividade, menor custo e maior eficiência energética. A rota mais eficiente será aquela que maximiza o valor dos coprodutos gerados. Problemas no pré-tratamento podem gerar inibidores que reduzem o rendimento da fermentação. A planta Raízen, em São Paulo, Brasil, inaugurada em 2015, produz 40 milhões de litros de etanol por ano a partir de bagaço e palha de cana, beneficiando-se de avanços tecnológicos no pré-tratamento e uso de microrganismos geneticamente modificados para reduzir custos e garantir a viabilidade comercial (Pandiyani, 2019; Correa, 2023).

2.2. Fermentação

A fermentação é um processo metabólico complexo em que microrganismos, como bactérias e leveduras, convertem substratos orgânicos, principalmente carboidratos, em produtos finais como ácidos, gases ou álcool. Este processo ocorre, em grande parte das vezes, na ausência de oxigênio (condições anaeróbicas) e é essencial tanto em processos naturais quanto em aplicações industriais. Segundo Madigan *et al.* (2018), a fermentação é essencial na ciclagem de carbono em ecossistemas naturais e tem sido fundamental para a produção de alimentos e bebidas fermentadas desde tempos ancestrais.

No nível bioquímico, a fermentação envolve a glicólise, onde a glicose é convertida em piruvato, seguido pela transformação do piruvato em vários produtos finais dependendo do tipo de fermentação. Na fermentação alcoólica, predominante em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, o piruvato é convertido em etanol e dióxido de carbono (Barnett *et al.*, 2011). Este processo complexo depende de fatores como a temperatura, a concentração de nutrientes e a presença de microrganismos específicos. A fermentação alcoólica também é afetada pela presença de enzimas, como a enzima álcool desidrogenase, que catalisa a conversão de moléculas de carboidratos em moléculas de álcoois (Bauer *et al.*, 2003). Em contraste, a fermentação láctica, realizada por bactérias como *Lactobacillus*, resulta na conversão do piruvato em ácido láctico, sendo um processo fundamental na produção de produtos como iogurte e chucrute (Kandler; Weiss, 1986).

O processo fermentativo começa com a preparação do meio de fermentação, cuja composição varia conforme o produto desejado. Em seguida, ocorre a fermentação, onde microrganismos como bactérias, leveduras e fungos transformam a matéria-prima nos produtos almejados. Após essa etapa, são realizados tratamentos finais para assegurar a qualidade e pureza do produto. O meio de fermentação deve conter uma fonte de carbono, como cana-de-açúcar, frutas, leite, malte, melação, lignocelulósicos, óleos vegetais e álcoois. Este meio pode representar até 70% do custo total de produção, tornando essencial a escolha de fontes mais baratas para reduzir os custos (EMBRAPA, 2021).

A fermentação também apresenta significativas aplicações industriais. Na indústria de biocombustíveis, por exemplo, a fermentação é utilizada para a produção de bioetanol a partir de biomassa vegetal, representando uma alternativa renovável aos combustíveis fósseis (Balat, 2011). Além disso, a biotecnologia moderna tem explorado a fermentação para a produção de produtos de alto valor agregado, como enzimas, antibióticos e outros produtos farmacêuticos, através da engenharia genética de microrganismos (Demain; Vaishnav, 2009).

2.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura unicelular, com formato geralmente esférico ou oval, e não forma filamentos. Pertence ao filo *Ascomycota* e possui uma estrutura celular eucariótica. Sua composição inclui uma parede celular,

uma membrana plasmática, um citoplasma com diversas organelas membranosas e um núcleo. A levedura reproduz-se tanto assexuadamente quanto sexualmente. Durante a reprodução assexuada, ocorre o brotamento, onde uma protuberância se forma na célula-mãe e se desprende após a migração do núcleo, originando uma célula-filha. A reprodução sexuada, por sua vez, só acontece entre indivíduos de diferentes tipos sexuais (*mating type a* ou α) (Pelczar; Chan; Krieg, 1997).

S. cerevisiae é uma das leveduras mais conhecidas por seus processos fermentativos, incluindo a panificação, a fabricação de cerveja e a produção de bioetanol. Além disso, essa espécie tem se mostrado extremamente valiosa em estudos fundamentais de bioquímica e genética (Eardley *et al.*, 2020). Ela é naturalmente encontrada em habitats ricos em açúcar e podem ser consideradas como espécies invasoras microbianas devido à sua natureza dominante e capacidade de produzir biocidas. O metabolismo e a genética do organismo são bem estudados, e todo o sequenciamento do seu genoma está disponível em domínio público (Gandasi *et al.*, 2024).

Essas leveduras são capazes de crescer em ambientes anaeróbios facultativos, o que significa que podem obter energia química na forma de ATP tanto na presença quanto na ausência de oxigênio (Pelczar; Chan; Krieg, 1997). A capacidade de conversão de fonte de carbono, como glicose e frutose, em etanol é uma das características mais exploradas da levedura. Embora prefiram a via respiratória em ambiente rico em oxigênio, em condições anaeróbicas, a sacarose é hidrolisada em glicose e frutose pela ação da enzima sacarase ou invertase, sendo essas moléculas então direcionadas para a via glicolítica, onde são convertidas em duas moléculas de piruvato. Devido à ausência de oxigênio, o ciclo de Krebs é bloqueado, fazendo com que o piruvato siga pela rota fermentativa. Nesse processo, a enzima piruvato descarboxilase promove a descarboxilação do piruvato, resultando na produção de duas moléculas de CO₂ e duas de acetaldeído. Em seguida, a enzima álcool desidrogenase converte as moléculas de acetaldeído em duas moléculas de etanol (Gandasi *et al.*, 2024; Madigan *et al.*, 2010). As indústrias utilizam essa via metabólica do organismo para a produção em massa de etanol, tanto em bebidas alcoólicas quanto em bioetanol, que é uma alternativa ao combustível fóssil (Chen *et al.*, 2024).

Dentre as diferentes linhagens existentes da *S. cerevisiae*, há algumas que se destacam e são aplicadas em processos industriais, são elas, a PE-2 e

CCUG53310, as quais possuem uma resistência superior e uma eficiência de conversão maior de diversas fontes de glicose, além de apresentar uma resistência a estresse osmótico (Cunha *et al.*, 2015; Cruz, 2021; Gonçalves *et al.*, 2019).

Em um estudo conduzido por Pereira *et al.* (2011), observou-se que a linhagem industrial de levedura PE-2 demonstra várias vantagens em fermentações de alta gravidade (VHG). Ela é capaz de produzir altos níveis de etanol (acima de 19% v/v) com alta produtividade (>2,5 g/L/h). A produção de etanol é significativa após 24 horas, momento em que o crescimento da levedura essencialmente cessa e mais da metade do etanol é gerado. Além disso, a PE-2 acumula glicerol em resposta ao choque osmótico, o que ajuda a restaurar a viabilidade celular após uma perda inicial, destacando-se com uma viabilidade superior a 85% até uma concentração de etanol de 140 g/L. Essa linhagem pode acumular níveis mais elevados de glicogênio em comparação com outras, como por exemplo a linhagem de laboratório CEN.PK113-7D, proporcionando uma vantagem adaptativa nas rigorosas condições de fermentação.

2.4. Sabugo de milho

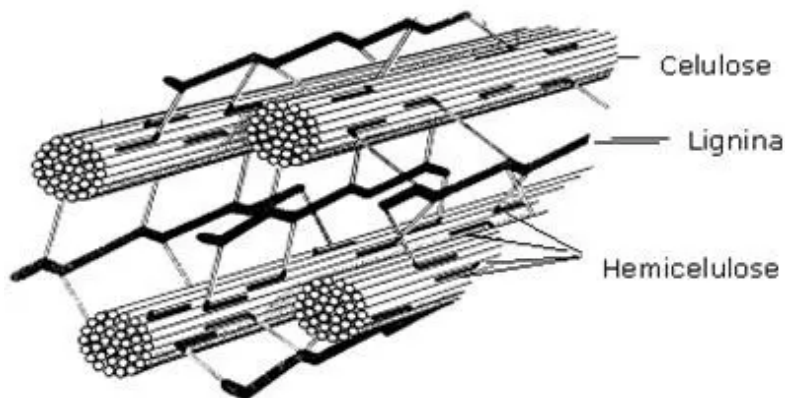
Conforme informações da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2021), o milho é de grande importância econômica devido à sua ampla aplicação, que vai desde a alimentação animal até setores de alta tecnologia. No contexto global, cerca de 70% do milho é utilizado na alimentação de animais. Nos Estados Unidos, aproximadamente metade da produção de milho é destinada a essa finalidade, enquanto no Brasil essa proporção varia de 60% a 80%. No Brasil, o milho é cultivado em 3,6 milhões de propriedades rurais, ocupando uma área de 14 milhões de hectares na safra 2007/2008, com uma produção de 58,6 milhões de toneladas e uma produtividade de 3.950 kg/ha. Nos últimos anos, a área plantada no país aumentou em 2,5 milhões de hectares e a produtividade cresceu em aproximadamente 40 milhões de toneladas.

O milho é uma das culturas mais plantadas no mundo, gerando um grande volume de espigas de milho como resíduo agrícola. A quantidade global de espigas de milho geradas é de aproximadamente 144 milhões de toneladas por ano, sendo que a maior parte é descartada ou queimada, causando grave poluição ambiental e nenhum benefício (Berber-Villamar *et al.*, 2018). Na indústria do milho, os resíduos gerados incluem palhas, sabugos, cascas e hastes. Para cada tonelada de milho

processado, aproximadamente 700 kg de palha e 180 kg de sabugo são produzidos. Uma parte desses resíduos é destinada à produção de ração animal, utilizada em fomalhas para geração de calor. O descarte inadequado do sabugo de milho, especialmente quando produzido em grandes quantidades, apresenta um desafio significativo (Souza *et al.*, 2019).

De acordo com uma pesquisa realizada por Pointner *et al* (2014), onde foram analisados dez diferentes variedades de sabugo de milho, pode-se observar que sua composição é predominantemente de hemicelulose (44,4% \pm 5,2%), seguida de celulose (38,8% \pm 2,5%) e lignina (11,9% \pm 2,3%), além de açúcares simples, proteínas, lipídios, água, amido, hidrocarbonetos e outros compostos (Figura 1). Estruturalmente, o sabugo de milho é composto por quatro partes principais: palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula. A palha fina constitui a parte externa, a palha grossa forma uma camada interna à palha fina, o anel lenhoso está situado no interior, recobrendo a medula que é o núcleo central. A palha fina representa 4,1% do peso do sabugo, a palha grossa 33,7%, o anel lenhoso 60,3% e a medula 1,9% do peso total do sabugo de milho (Souza *et al.*, 2019).

Figura 1 - Macromoléculas que compõem os materiais lignocelulósicos.



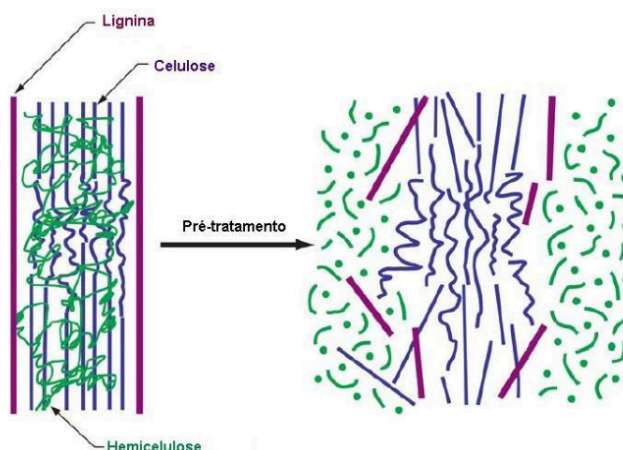
Fonte: Adaptado de (Souza, 2017).

2.5. Pré-tratamento de Resíduos Lignocelulósicos

O pré-tratamento tem origem nos estudos para utilização de madeira, especialmente para fabricação de papel e celulose. Estudos de 1819 de Henri Braconnot, um químico e farmacêutico alemão que relatou ter obtido glicose a partir do tratamento da madeira com ácido sulfúrico concentrado. Além também de ser aplicado nos resíduos da agricultura que iam para a alimentação de ruminantes para que eles se tornassem mais digestivos (Silva, 2018).

Como supracitado, a composição estrutural dos materiais lignocelulósicos é rígida e complexa, composta por lignina, hemicelulose e celulose, sendo impossível fazer uma fermentação para produção de etanol sem nenhum tipo de tratamento nesses materiais (Silva, 2018). Por isso, é necessário que esse resíduo passe por alguns processamentos, o tornando viável para fermentação. A primeira etapa e uma das mais essenciais é o pré-tratamento, o qual consiste na solubilização eficiente dos componentes estruturais, principalmente da lignina e hemicelulose (Figura 2), facilitando a digestão do resíduo para a etapa subsequente, a hidrólise enzimática (Lima *et al.*, 2019).

Figura 2 - Ilustração do efeito que o pré-tratamento tem sobre os resíduos lignocelulósicos.



Fonte: Silva, 2011.

O pré-tratamento pode ser realizado por diferentes técnicas, como tratamentos físicos, químicos, biológicos e também pela combinação destas, como demonstrado na Tabela 1 (Santiago, Rodrigues, 2017).

Tabela 1 - Técnicas de pré-tratamento de resíduos lignocelulósicas para produção de etanol 2G.

Métodos Físicos	Métodos Químicos	Métodos Biológicos	Métodos Combinados
Vapor	Ozonólise	Fungos	Explosão à vapor
Radiação	Hidrólise com ácido diluído	Biorganosolv	Hidrotérmico
Moinho de Bolas	Hidrólise com ácido concentrado		SO ₂ e vapor
Umidificação	Organosolv		NO ₂ e irradiação
	Hidrólise Alcalina		Amônia e vapor (AFEX)

Fonte: Adaptado de Silva, 2009.

Essa etapa é uma das mais importantes em termos de custo, representando até 20% do custo total de produção (Lima *et al.*, 2019) e também do custo e sucesso das etapas posteriores. O pré-tratamento tem relação com a fase de preparação do resíduo, com a hidrólise da celulose, da geração de produtos que podem inibir a hidrólise enzimática e a própria fermentação, tratamento de resíduos e até geração de energia (Silva, 2011).

2.5.1. Pré-tratamento Físico

Os pré-tratamentos físicos reduzem o tamanho das partículas, ou seja, aumentam a área superficial, facilitando o acesso das enzimas à celulose (Pinheiro, 2022). Entretanto, em alguns casos, somente a redução das partículas não é suficiente para um bom rendimento das etapas posteriores (Santos, 2014), além de ser um método oneroso, haja visto, que quanto mais fino, maior é o consumo de energia do equipamento (Talebniya, Karakashev, Angelidaki, 2009).

Porém, estudos estão demonstrando que o pré-tratamento físico junto a outra técnica, tem contribuído para um aumento na eficiência da hidrólise e melhorias no custo do processo (Pinheiro, 2022).

2.5.2. Pré-tratamento Químico

O pré-tratamento químico é um método muito comum e utilizado para decompor as estruturas do material, principalmente a lignina e a hemicelulose. As técnicas são relacionadas com a adição de ácidos, alcalinos e bases sob diferentes condições, a fim de melhorar a degradabilidade (Nakaema, 2021). É considerado um dos métodos mais promissores no desenvolvimento das biorrefinarias de etanol de segunda geração pela sua eficácia na transformação da biomassa e diminuição da degradação ambiental (De Oliveira e Souza, 2021).

2.5.2.1. Pré- tratamento ácido

O pré-tratamento ácido é uma das técnicas mais difundidas de solubilização dos açúcares do material lignocelulósico, tendo como base a adição de um ácido mineral. A mistura deste com o material é colocada em condições específicas de temperatura, tempo e pressão (Santiago, Rodrigues, 2017).

Esse tipo de pré-tratamento é responsável por causar a ruptura de Van der Waals, ou seja, rompe as ligações de hidrogênio e ligações covalentes unidas na biomassa, resultando na eliminação da hemicelulose. Os agentes mais comuns envolvidos incluem ácido sulfúrico, clorídrico, fórmico, acético e nítrico (Nakaema, 2021).

O objetivo principal é tornar a celulose mais acessível aos reagentes, para que se obtenha uma alta recuperação dos açúcares fermentescíveis na fração líquida do pré-tratamento e uma fração sólida de celulose com alta taxa de conversão enzimática. Pode ser utilizado tanto para apenas hidrolisar a

hemicelulose, mas também para tratar inicialmente o resíduo e facilitar a hidrólise enzimática em hexoses e pentoses, como glicose e xilose, respectivamente. O procedimento pode ser feito com ácidos concentrados ou diluídos e vai ser definido a partir do material a ser utilizado no processo (Silva, 2018).

O pré-tratamento com ácidos diluídos, geralmente entre 0,2% e 2,5% p/p é o mais eficaz para resíduos lignocelulósicos (Silva, 2018) e tem algumas vantagens em comparação ao com ácidos concentrados, haja visto que este precisa de mais cuidados, pois são reagentes tóxicos, danosos aos equipamentos, pois os corroem e tem maior chance de formar compostos que atuam inibindo o processo de fermentação para produção de etanol, como hidroximetilfurfural, furfural e ácido acético, além disso, possuem um longo tempo de reação, o que acaba consumindo bastante energia (Talebna, Karakashev, Angelidaki, 2009). Enquanto isso, a técnica com ácidos diluídos é feita em uma fração de segundos ou minutos, sendo conduzidos em altas temperaturas e pressão, com menos geração de produtos secundários e boa digestibilidade do material, sendo correlacionado com a remoção eficiente da fração hemicelulósica. Entretanto, o pH ao final do processo precisa ser corrigido para não afetar a fermentação (Silva, 2009).

O ácido sulfúrico diluído é um dos ácidos bastante empregados e possui rendimento elevado, amplifica a área de superfície da celulose e altera a estrutura da lignina. Ademais, ele também apresenta baixo custo, tornando-se um método convencional para indústrias e laboratórios (Silva *et al.*, 2022).

2.5.2.2. Pré-tratamento alcalino

O pré tratamento alcalino está baseado na utilização de bases diluídas, como hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônia. Geralmente, esta técnica utiliza baixas temperaturas e pressão (Talebna, Karakashev, Angelidaki, 2009) e visa a remoção da fração de lignina através de reações de clivagem das ligações tipo éter entre unidades de fenilpropano, que compõem a lignina. Isso contribui para o aumento da área superficial da celulose e diminui seu grau de polimerização e cristalinidade (Santiago, Rodrigues, 2017). Uma das vantagens desse procedimento é sua baixa corrosão de equipamentos e a boa degradabilidade em baixas temperaturas, entretanto, a grande desvantagem do método é o longo tempo de reação, que pode ir de horas até dias (Pinheiro, 2022) e também a conversão de

alguns álcalis em sais ou na sua incorporação como sais na biomassa pelas reações que ocorrem durante o processo (Souza, 2021).

Algumas bases podem ser bem caras, mas o uso de hidróxido de cálcio, o qual é barato e pode ser recuperado após o processo (Talebnia, Karakashev, Angelidaki, 2009). Chang, Nagwani, Holtzaple (1998) demonstrou que a utilização de hidróxido de cálcio por um curto tempo (1 a 3h) era necessário altas temperaturas (85-135 °C) para chegar em altos rendimentos de açúcar, enquanto um período maior (24h) e temperaturas baixas (50-65 °C) demonstrou ser mais eficaz.

2.5.3. Pré-tratamento biológico

O pré- tratamento biológico utiliza microrganismos, como fungos e bactérias que através da produção e secreção de enzimas, removem a fração de lignina no material (Pinheiro, 2022). É um processo de alto custo, com baixo rendimento de produção, longos tempos de reação e envenenamento dos microrganismos pelos derivados da lignina (De Oliveira e Souza, 2021).

2.5.4. Pré-tratamento Combinado (Físico-químico)

O pré-tratamento físico químico é a combinação de dois tratamentos, como os supracitados e tem como ação a solubilização da hemicelulose e alteração na estrutura da lignina para melhor acessibilidade à celulose (Weinem, 2022). Essa solubilização vai depender de temperatura, pH e componentes da mistura. Água quente, explosão a vapor e AFEX (expansão de fibra de amônia) são exemplos desses métodos combinados (Talebnia, Karakashev, Angelidaki, 2009).

O método de explosão a vapor vem sendo muito utilizado, onde o material é submetido a alta pressão saturada, estando entre 6 e 34 bar e uma temperatura que vai de 160 a 240 °C, em um tempo curto de reação, indo até 15 minutos. Ao final do processo, condiciona-se o material a uma rápida descompressão (Santos, 2014) causando uma forma de explosão na parede celular (Isidoro, 2022). Ele tem como vantagem a não necessidade de gastar com tratamento de efluentes e de moer a biomassa (Pinheiro, 2022).

O processo hidrotérmico é extremamente parecido com o de explosão a vapor, diferenciando apenas o uso de água quente pressurizada no lugar do vapor, o que aumenta a solubilização do material. Este pré-tratamento por si só não é eficaz para a remoção da lignina, isso porque ocorre condensação dos componentes

solúveis desta, precisamos de um tratamento subsequente. Entretanto, é um processo visto de forma vantajosa, pois não há aditivos e o sistema de reatores por não necessitar ser resistentes à corrosão, são mais baratos (Do Espírito Santo, 2015).

O método AFEX (expansão de fibra de amônia) ocorre em um sistema fechado, com temperatura e pressão elevadas (100-180 °C e 17-20 bar, respectivamente) para manter a amônia atuante como catalisadora da reação em um tempo variando de 5 a 30 minutos. No final do processo também ocorre uma descompressão brusca da amostra, rompendo a lignina. Diferentemente da explosão a vapor, a quantidade de água utilizada é menor e observa-se uma baixa hidrólise da hemicelulose. Entre as vantagens estão a não formação de inibidores, não necessidade de etapa de neutralização do material, alta recuperação de açúcares, podendo chegar a 90% (De Paula Moraes, 2018).

2.6. Hidrólise

A hidrólise é uma etapa posterior ao pré-tratamento, pois os polissacarídeos estão expostos e podem ser hidrolisados em açúcares de cadeias menores e que podem ser fermentados, como a glicose. A hidrólise pode ser feita pela ação de ácidos e de enzimas (Santos, 2014). A diferença entre as duas técnicas está no mecanismo de ação, enquanto a hidrólise ácida é conduzida com substâncias ácidas de alto rendimento, que geram reações secundárias, já que não são específicas, a hidrólise enzimática utiliza enzimas catalisadoras de alta especificidade, não gerando reações secundárias, pois atinge o sítio ativo da celulose (Isidoro, 2022).

2.6.1. Hidrólise enzimática

É um processo que se constitui pela ação de enzimas específicas, as celulasas (Santos, 2014), em que o processo catalítico está baseado na adsorção das celulasas na superfície do substrato, com quebra das ligações. Por isso, o pré-tratamento é extremamente importante, pois aumenta essa adsorção, conseqüentemente, a maior taxa de conversão em açúcares fermentescíveis, podendo ter um rendimento de até 90% (Costa *et al.*, 2021).

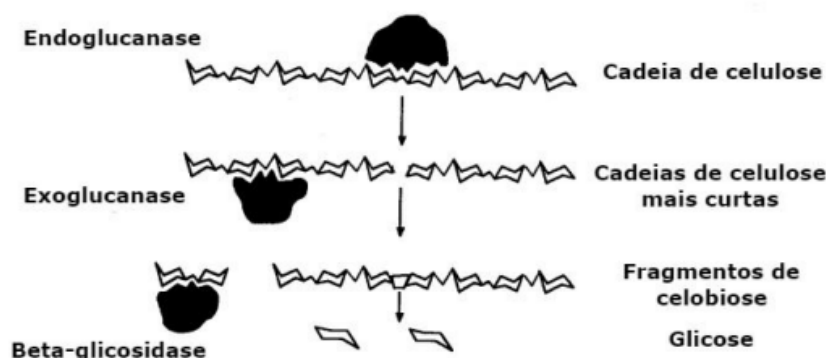
Essas enzimas têm origem de microrganismos, como leveduras e fungos filamentosos, em que o último se destaca como fonte principal de produção. Isso

porque eles conseguem produzir altas concentrações de diversas enzimas que têm atividades complementares (Florencio, Badino, Farinas, 2017).

Na realidade, as celulases são um coquetel enzimático, ou seja, possuem enzimas atuando sinergicamente e são divididas em três classes, as endo- 1,4- β -D-glucanases ou endoglucanases que clivam as ligações internas, as exo-1,4- β -D-glucanases ou exoglucanases, que atuam na parte externa e as 1,4- β -D-glucosidases ou β - glicosidases que atuam hidrolisando oligossacarídeos e os transformando solúveis em glicose (Figura 3) (Ogeda, Petri, 2010; De Castro, Pereira Júnior, 2009).

As endoglucanases são responsáveis por iniciar o processo de hidrólise catalisando internamente as ligações β - 1,4 glicosídicas, atuando de forma aleatória nas regiões amorfas. As regiões que possuem menor organização estrutural são atacadas mais facilmente, já que possuem cadeia não envolvidas nas interações de hidrogênio que ocorrem nas regiões cristalinas, expondo as ligações mais internas. Então, as exoglucanases atuam na hidrólise primária da fibra celulósica a partir da ruptura física do substrato, desestratificando as fibras pelo aumento das regiões intersticiais, assim ela torna as regiões cristalinas em amorfas, as deixando mais expostas. E por fim, a β - glicosidase converte a celobiose em glicose e os oligossacarídeos solúveis se tornam menos polymerizados (Do Espírito Santo, 2015; Castro, Pereira Júnior, 2009; Ogeda, Petri, 2010; Cagliari, 2018).

Figura 3 - Ação catalítica do complexo enzimático das celulases na celulose, gerando glicose.



Fonte: Cagliari, 2018.

Os processos envolvendo enzimas são eficazes e vantajosos, haja visto o alto rendimento em condições mais brandas e é um processo menos poluente, em contrapartida é um processo também caro, mas levando em consideração ser uma boa alternativa ecológica, é o método mais eficiente existente (Santos, 2014).

2.7. Inibidores da fermentação alcoólica

2.7.1. Temperatura

A temperatura é um fator essencial que afeta o crescimento e o metabolismo das leveduras, com a temperatura ideal e a tolerância ao calor variando entre as espécies, algumas suportando mais de 40°C. Diferentes temperaturas influenciam a atividade metabólica e o crescimento das leveduras devido à genética das cepas, composição do meio de crescimento, pH, agentes químicos, desidratação osmótica, estado nutricional e fase de crescimento. Altas temperaturas afetam drasticamente os componentes celulares, como proteínas e membrana plasmática, alterando os lipídios da membrana e resultando em menos insaturações. Danos térmicos nas células de levedura são causados pelo rompimento das ligações de hidrogênio e desnaturação de proteínas e ácidos nucleicos, o que leva a uma diminuição rápida da viabilidade celular, apesar dos mecanismos fisiológicos e metabólicos de regulação de temperatura. A integridade da membrana plasmática, crucial para a função celular, é comprometida por danos que alteram a fluidez da membrana, dependente do grau de saturação dos fosfolipídios. Carratu *et al.* (1996) sugeriram que a composição da membrana, especialmente o padrão de saturação e insaturação dos ácidos graxos, está envolvida na resposta ao choque térmico, com outros estudos também mostrando que a composição lipídica da membrana afeta a resposta da levedura ao estresse térmico (Monaco, 2007).

2.7.2. Concentração de etanol

Na fermentação, o acúmulo de etanol representa um estresse químico significativo para as células de levedura, sendo um problema relevante na biotecnologia e na indústria alcooleira. Esse composto aumenta a permeabilidade da membrana plasmática, facilitando a entrada de íons e pequenos metabólitos, além de reduzir a disponibilidade de água celular, o que compromete a estabilidade da membrana e das enzimas. Ingram (1976) descobriu que o etanol diminui a fluidez da membrana celular ao se intercalar na bicamada lipídica, limitando a movimentação das cadeias de ácidos graxos. Piper *et al.* (1994) observaram que o estresse etanólico e térmico em *Saccharomyces cerevisiae* estimula a atividade da ATPase da membrana plasmática. Marques e Serra (2004) notaram que, em reciclos fermentativos com *S. cerevisiae* IZ-1904, a concentração de álcool no vinho

aumentou gradualmente ao longo de oito ciclos, interferindo no desempenho fermentativo das leveduras, sugerindo a necessidade de estudar métodos para mitigar os efeitos degenerativos do etanol (Monaco, 2007).

2.7.3. Influência do magnésio no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*

Os íons metálicos são cruciais para a fermentação alcoólica, impactando a fisiologia das células de levedura. Metais como potássio, magnésio, cálcio, manganês, ferro, cobre e zinco são vitais para o crescimento das células de *Saccharomyces cerevisiae*, auxiliando no transporte através da membrana plasmática, na estrutura e na funcionalidade celular (Monaco, 2007).

O magnésio, em particular, tem um papel essencial em funções estruturais e metabólicas, atuando como cofator em enzimas relacionadas à glicólise, transporte celular e processos de replicação, transcrição e tradução de DNA. Uma maior disponibilidade de magnésio para as células de levedura prolonga a fase de crescimento exponencial, resultando em maior massa celular, aumento na conversão de carboidratos em álcool e redução do tempo necessário para essa conversão. Além disso, o magnésio é crucial para a estabilização e manutenção da permeabilidade celular, especialmente dos lipopolissacarídeos da membrana plasmática. Também é indispensável para a estabilidade de estruturas subcelulares como ribossomos e mitocôndrias. A deficiência de magnésio pode reduzir a produção de álcool, limitar o crescimento celular e diminuir a eficiência na conversão de carboidratos em etanol. A adição de magnésio na fermentação prolonga a fase de crescimento das leveduras, aumentando a massa celular sem afetar sua viabilidade, reduzindo o tempo necessário para converter glicose em álcool em cerca de um terço e aumentando a velocidade da fermentação (Monaco, 2007).

2.8. Álcool em gel

Existem vários produtos antissépticos disponíveis no mercado, mas nenhum destes é completamente eficaz em todas as situações. Um dos produtos mais utilizados é o álcool etílico a 70%, geralmente utilizado na forma de gel para higienização das mãos. As formulações de álcool em gel podem ser comerciais ou sob medida, sendo que as preparações sob medida não necessitam de registro na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e não precisam passar por testes de eficácia e segurança, ao contrário dos produtos comerciais que necessitam

desses testes para obter o registro. Em relação aos produtos manipulados, é necessário apenas apresentar estudos que descrevam aspectos como aparência, características sensoriais, viscosidade e pH. Considerando esses pontos, vê-se uma maior facilidade para a produção desses produtos, inclusive em relação a adição de essências e colorantes (Brasil, 2007; Gisch *et al.*, 2017).

A ideia de dispersões coloidais surge com Thomas Graham em 1860, que aponta essas dispersões como a mistura de dois ou mais componentes que em conjunto apresentam propriedades intermediárias entre soluções e suspensões. Atualmente, tem-se que esses colóides apresentam massas molares elevadas e as partículas são razoavelmente grandes, visto que apresentam cerca de 1000 nm de diâmetro. É cabível ainda separar os colóides em dois grupos: sóis e géis. O sol se refere à dispersão de um componente sólido em um meio fluidizado. Já o gel se refere a uma rede que é expandida na totalidade em um fluido, seja essa polimérica ou coloidal não fluida. No caso de uma formulação de álcool em gel por exemplo, quando o agente gelificante entra em contato e é dissolvido com a solução é considerado um sol e quando o agente basificante é adicionado se torna um gel (Sequinel *et al.*, 2020).

Nesse aspecto, pode-se elencar a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 490, publicada em 8 de abril de 2021, visto que é essa rege as preparações antissépticas à base de álcool. Visa garantir que esses produtos atendam a rígidos padrões de qualidade e segurança para proteger os usuários desse produto e a saúde pública em geral. Para isso, a RDC nº 490 estabelece requisitos detalhados para o registro na Anvisa, solicitando testes de controle de qualidade e fabricados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação. Além disso, a resolução define critérios em relação à rotulagem dos produtos, explicitando sobre composição, modo de usar e precauções. É importante ressaltar que a RDC nº 490 altera a RDC nº 46, sendo que essa alteração de alguns artigos serve para garantir que as normas estejam sempre atualizadas e em consonância com os avanços técnicos e científicos. Essa resolução também foi publicada visando regularizar a produção de álcool em gel que aumenta grandemente com a pandemia da doença infecciosa COVID-19 (do inglês *Coronavirus Disease-2019*) entre 2020 e 2021, fortalecendo a vigilância sanitária e promovendo o uso seguro e eficaz desses produtos (Brasil, 2021; Brasil, 2002; Jing *et al.*, 2020).

Em comparação com a lavagem das mãos com água e sabão, pode-se elencar que as soluções alcoólicas apresentam vantagens como a inativação veloz de um vasto espectro de microrganismos patogênicos, é mais prático em locais sem acesso a água descontaminada, além de ser considerada mais barata ao considerar os materiais necessários, tempo de lavagem e secagem das mãos e o processo ser realizado com água descontaminada quando se utiliza a lavagem com água e sabão. É interessante pontuar que quando em concentração de 70% de etanol, o álcool em gel demonstra um resultado satisfatório em relação a higienização, visto que nesta concentração a velocidade de evaporação do etanol é diminuída, aumentando o tempo nas mãos e, conseqüentemente, aumentando o tempo de ação do produto (Sequinel *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2022; World Health Organization, 2020).

Abordando em relação a formulações desse composto geralmente incluem etanol 96% (v/v) para diluição água purificada ou 70%, solução de trietanolamina ou outro basificante como neutralizante, glicerol como umectante e um agente gelificante. Este último é o que embasa a o produto, visto que modifica a viscosidade e assegura a estabilidade do gel através de interações fortes de ligação de hidrogênio entre os compostos, como exemplo dos gelificantes tem-se o Carbopol®, hidroxietilcelulose e carboximetilcelulose, sendo o primeiro elencado, também é conhecido como carbômero 980, o mais utilizado em formulações de álcool em gel. Entretanto, mesmo que esse polímero seja utilizado majoritariamente, alguns estudos já demonstraram que alguns organismos aquáticos podem sofrer efeitos adversos devido a presença de carbômero 940 em seu meio, apontando a necessidade de mais estudos para alcançar a qualidade desse agente com outros (Sequinel *et al.*, 2020; D'Alessandro *et al.*, 2024)

Portanto, tem-se que o álcool em gel é um produto antisséptico de grande relevância atual, com maior importância após a pandemia de COVID-19, visto que se popularizou o conhecimento sobre as infecções microbiológicas e cuidados que podem ser tomados. A eficácia do produto citado, quando em concentração, deve agir na inativação de diversos patógenos, incluindo uma ampla gama de vírus, fungos e bactérias, fazendo com que esse esteja presente em diversos espaços públicos e auxilia na prevenção de infecções e na própria manutenção da saúde pública (D'Alessandro *et al.*, 2024; Caetano *et al.*, 2022). Além disso, utilizar etanol de segunda geração é interessante para a confecção do gel, pois promove uma

imagem de produto sustentável, representando uma opção de aplicação interessante em relação a rentabilidade e impacto social, elencando a demanda por produtos de higiene pessoal e sanitização.

3. OBJETIVOS

Produzir etanol de segunda geração a partir do sabugo de milho, através do pré-tratamento ácido, hidrólise enzimática e fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. A finalidade desse processo é utilizar o etanol resultante na formulação de álcool em gel.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho do pré-tratamento e hidrólise do sabugo de milho;
- Dimensionar o processo de produção;
- Obter uma produção de etanol utilizando hidrolisado que se equipare a produção com glicose comercial;
- Produzir álcool em gel de acordo com as especificações da ANVISA;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Um fluxograma detalhado de toda a metodologia utilizada no desenvolvimento do projeto está incluído no Apêndice I.

4.1. Preparo do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 em Erlenmeyer

As culturas de *S. cerevisiae* PE-2 foram adquiridas em meios semi sólidos, reativadas por um período de uma semana, as operações a seguir foram executadas visando proteger a levedura de contaminações, mantendo a pureza da linhagem, ocorrendo dentro de um fluxo laminar, com vidrarias e materiais previamente esterilizados em autoclave a uma temperatura de 120°C por um período de 20 minutos (Reis, 2016; Camargo, 2022).

4.1.1. Preparo dos meios de cultivo e fermentação

4.1.1.1. Meio de reativação

O meio de reativação esteve composto por YEPD (do inglês Yeast Extract - Peptone - Dextrose), contendo peptona (10g.L⁻¹), extrato de levedura (10g.L⁻¹) e glicose (20g.L⁻¹). Os reagentes foram misturados em um béquer com água destilada e agitação constante por meio de um agitador magnético Fisatom e barra magnética, também fazendo uso de uma bagueta para garantir a homogeneização do meio, em

seguida com auxílio de um pHmetro Tecnal, previamente calibrado, a solução foi ajustada para o pH para 5,5 com ácido sulfúrico 0,1M, depois, o volume foi regulado com uma proveta e dividido entre frascos tipo Erlenmeyer (Silva, 2020).

4.1.1.2. Meio de propagação

O meio de propagação é composto por sacarose (100 gL^{-1}), extrato de levedura ($2,5 \text{ gL}^{-1}$), uréia ($0,6 \text{ gL}^{-1}$), fosfato dipotássico ($0,9 \text{ gL}^{-1}$), sulfato de magnésio heptahidratado ($0,5 \text{ gL}^{-1}$), sulfato de zinco heptahidratado ($0,03 \text{ gL}^{-1}$), sulfato de manganês heptahidratado ($0,02 \text{ gL}^{-1}$), de forma semelhante ao item 4.1.1.1, as substâncias foram adicionadas em um béquer com água destilada, misturado com auxílio de barra magnética e agitador magnético Fisatom, posteriormente o pH do meio foi ajustado para 5,5 com um pHmetro Tecnal e ácido sulfúrico diluído 0,1M, como mostrado na Figura 4, sendo que o volume foi acertado com auxílio de uma proveta que também foi utilizada para distribuir igualmente o meio entre os frascos tipo Erlenmeyer (Furlani, 2014; Silva, 2020).

Figura 4 - Ajuste do pH do meio de propagação.



Fonte: Autores, 2024.

4.1.1.3. Meio de Fermentação

A produção do meio de fermentação foi realizada com os mesmos aditivos do item 4.1.1.2, extrato de levedura ($2,5 \text{ gL}^{-1}$), uréia ($0,6 \text{ gL}^{-1}$), fosfato dipotássico ($0,9 \text{ gL}^{-1}$), sulfato de magnésio heptahidratado ($0,5 \text{ gL}^{-1}$), sulfato de zinco heptahidratado ($0,03 \text{ gL}^{-1}$), sulfato de manganês heptahidratado ($0,02 \text{ gL}^{-1}$) e a fonte de carbono foi o hidrolisado de sabugo de milho ou uma combinação de glicose e xilose nas mesmas concentrações do caldo de hidrolisado de sabugo de milho (18 g de açúcares redutores por litro de água), por fim, de forma análoga aos outros meios de cultura, o

pH foi ajustado para 5,5 com o pHmetro Tecnal, tendo o volume ajustado com proveta e distribuído entre os frascos tipo Erlenmeyer (Furlani, 2014; Silva, 2020).

4.2. Expansão do levedo

A expansão da cultura celular partindo de *S. cerevisiae* PE-2 na placa, foram repicadas (em triplicatas), em 10 mL de meio YEPD líquido, em vidrarias tipo Erlenmeyer de 50 mL, que foram previamente autoclavados, sendo que transferência foi executada por meio de uma alça descartável dentro do fluxo laminar, de forma que a assepsia foi assegurada, em seguida o cultivo permaneceu no interior de uma BOD solab SL - 117/250 por um período de 24 horas a uma temperatura de 30°C. Após esse intervalo de tempo, serão repassados 2 mL da cultura para 60 mL de meio de propagação em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL, incubando por 48 horas a 30°C em um agitador orbital Gyromax 737R com uma rotação de 150 rpm. Seguindo o mesmo procedimento, a cultura foi posteriormente transferida em 250 mL de um frasco tipo Erlenmeyer de 500 mL, deixando em agitador orbital por um intervalo de tempo de 48 horas, como mostrado na Figura 5 (Cherubin, 2003; Faria, 2010; Pavlak, *et al*, 2011; Covre, 2019; Silva, 2020).

Figura 5 - Erlenmeyer de 500mL destinado a expansão da levedura.



Fonte: Autores, 2024.

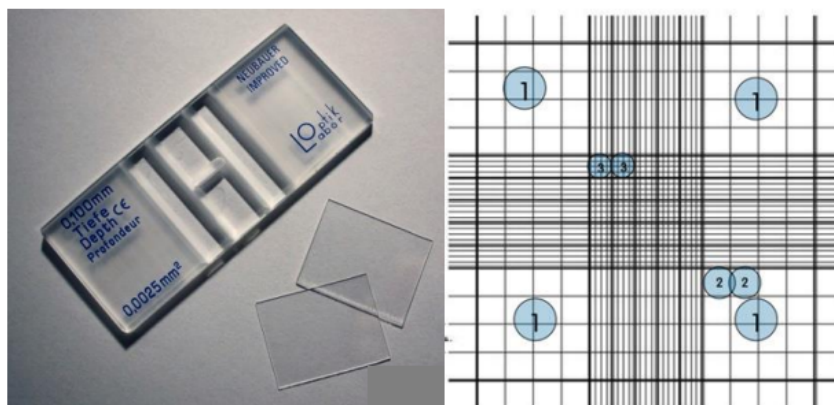
Visando reduzir os efeitos de contaminação das leveduras, toda a manutenção da cultura foi feita em câmara de fluxo laminar, desinfectada com álcool 70% e esterilizada com auxílio de uma lâmpada de luz ultravioleta por um intervalo de 15 minutos (Furlani, 2014).

4.3. Determinação da viabilidade celular do levedo

Para a execução da análise de viabilidade, foi preparado uma solução de azul de metileno, pesando 200 mg de azul de metileno em pó, posteriormente solubilizado em 100 mL de um balão volumétrico, em seguida foi coletado um volume de 20 μL da alíquota de uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, esse volume foi então depositado em um recipiente tipo Eppendorf, no qual foi previamente colocado 20 μL azul de tripano (corante). Em sequência a homogeneização, foi separado 10 μL da solução preparada e disposta no centro da Câmara de Neubauer, exibida na Figura 6, colocando uma lamínula acima da gota, sendo então feito a contagem com auxílio do microscópio óptico, onde foi observado a coloração de células azuis para as que são consideradas inviáveis. Por fim, com base nas equação 1, foi estimada a viabilidade celular (Lamounier, 2018; Silva, 2020).

$$Viabilidade = \frac{n^{\circ} \text{ de células vivas}}{n^{\circ} \text{ total de células}} \quad (1)$$

Figura 6 - Representação esquemática da Câmara de Neubauer.



Fonte: Rodrigues, 2017.

4.4. Armazenamento da levedura

Visando assegurar uma concentração celular satisfatória do levedo, os conteúdos presentes nos frascos tipo Erlenmeyer contendo o meio de propagação foram vertidos em frascos tipo Falcon P50 estéreis, esses frascos foram submetidos a uma centrifugação de 7000 rpm, a 10°C, em uma centrífuga CR 22N Hitachi® e depois as leveduras depositadas no fundo do tubo Falcon foram separadas do sobrenadante que foi guardado para a fase de purificação, em seguida ocorreu uma etapa de lavagem com água destilada e ressuspensas com auxílio do vortex XH-D,

sendo realizado outra centrifugação nos mesmos parâmetros aos anteriores, o precipitado foi então separado e ressuspensão em uma solução de glicerol 30% previamente autoclavada, armazenada em boeco estéril, a levedura preservada na solução de glicerol foi armazenada no freezer a uma temperatura -20°C , como pode ser visto na Figura 7 (Silva, 2020; Camargo, 2022).

Figura 7 - Tubos tipo Falcon[®] P50 contendo glicerol 30% e *Saccharomyces cerevisiae* sedimentada.



Fonte: Autores, 2024.

4.5. Pré tratamento do sabugo de milho

4.5.1. Determinação do teor de umidade do sabugo de milho

Os sabugos de milho foram fornecidos pela Casa da Pamonha, localizada no mercado municipal de São Carlos. Então, eles foram secos a 70°C em estufa para serem triturados em moinho de facas e em seguida, foram triturados novamente em um liquidificador caseiro Mondial[®], como mostra a Figura 8.

Figura 8 - Sabugo de milho moído em moinho de facas e liquidificador.



Fonte: Autores, 2024.

Este foi deixado, novamente, em estufa a 70°C durante 24 horas e o teor de umidade do sabugo de milho foi determinado com o auxílio de uma balança semi-analítica equipada com infravermelho Shimadzu®. Para essa análise, foi utilizado aproximadamente 1,0 g de sabugo. A determinação desse parâmetro é de suma importância, pois foi utilizado para quantificar o volume de ácido necessário para o processo de pré-tratamento ácido do mesmo (Lopes, 2015; Qiao *et al.*, 2022).

4.5.2. Pré-tratamento ácido do sabugo de milho

O pré-tratamento ácido oxidativo do sabugo de milho foi realizado com base nos estudos de Liao *et al* (2023) utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio e ácido acético e água destilada, em uma proporção de 2:2:1 respectivamente. Dessa forma, o pré-tratamento se deu em 4 erlenmeyers de 1 L e em 4 erlenmeyers de 500 mL. Nos erlenmeyers de 1 L, 58g de sabugo de milho em base seca foram adicionados em cada um deles. Do volume total de 1 L, utilizou-se metade dele, ou seja, 500 mL, sendo estes compostos por 200 mL de ácido acético, 200 mL de peróxido de hidrogênio e 100 mL de água, além de 0,669 mL de ácido sulfúrico 25 mM como catalizador. Enquanto nos erlenmeyers de 500 mL, 29g de sabugo foram pesados e adicionados. O volume utilizado do total foi de 250 mL, sendo 100 mL de ácido acético, 100 mL de peróxido de hidrogênio e 50 mL de água e 0,334 mL de ácido sulfúrico 25 mM.

Os 8 erlenmeyers foram levados a um agitador orbital Amerex® a 60 °C e 150 rpm por 3 horas. Após o dado tempo, uma filtração com peneira foi realizada e a fração sólida do sabugo foi lavada até a neutralidade e encaminhada para a estufa, novamente, a 70°C por 24h e a fração líquida foi armazenada em frascos âmbar em câmara fria para o posterior tratamento de resíduos.

Após o pré-tratamento, o rendimento mássico dessa etapa foi calculado utilizando a Equação 2.

$$R = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Em que: $m_{inicial}$ = massa inicial seca do sabugo de milho (g); m_{final} = massa final seca de sabugo (g); R= rendimento mássico (%).

4.6. Hidrólise enzimática do sabugo de milho

O sabugo pré-tratado e seco foi submetido a hidrólise enzimática pela enzima *Cellic CTec2*, *Novozymes*[®], sendo 10 mL o volume utilizado. Utilizou-se toda a massa obtida pelo pré-tratamento, ou seja, 219,63g de sabugo e 1,10 L de solução tampão citrato de sódio 20 mM, pH 4,8. Dessa forma, o experimento foi realizado com 20% de consistência (massa seca/água) em um biorreator de 3L, com impelidor do tipo âncora, a 50 °C e com agitação de 150 RPM por 72h (Figura 9).

Figura 9 - Sistema montado para realização da hidrólise enzimática.



Fonte: Autores, 2024.

Uma amostra de 2 mL foi retirada logo no início do processo e outra no final das 72h de hidrólise. Ambas foram centrifugadas a 1200 RPM, por 7 minutos em centrífuga de rotor fixo Hettich[®]. Foram adicionados 130 µL de ácido tricloroacético (TCA) para sedimentar proteínas e enzimas nas amostras e centrifugou-se novamente nas mesmas condições. Por fim, elas foram diluídas 200 vezes e levadas para a análise em Cromatógrafo Shimadzu[®] (coluna HPX-87H, Bio-Rad), com fase móvel ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹, vazão de 0,6 mL/min, temperatura do forno a 60°C e detector de índice de refração RID-10A) para que a fosse possível encontrar os açúcares redutores totais (ART).

Ao final das 72h, todo o conteúdo do biorreator foi dividido em 4 recipientes para serem centrifugados a 9.000 RPM por 10 minutos na centrífuga CR 22N Hitachi[®]. A fração sólida foi guardada em estufa e a fração líquida foi encaminhada para a fermentação.

O cálculo de conversão enzimática se deu pela seguinte equação 3 apresentada abaixo, sendo a quantidade de celulose pré hidrólise proveniente da literatura.

$$RH = \frac{GLI}{CEL} \times 0,9 \times 100 \quad (3)$$

Onde: RH= rendimento da hidrólise (%); GLI= quantidade de glicose no hidrolisado (%); CEL= quantidade de celulose pré hidrólise (%); 0,9= fator de conversão da celulose.

4.7. Ensaio de fermentação alcoólica para produção do etanol 2G

4.7.1. Ensaio Fermentação - Erlenmeyer - Hidrolisado

Em vidrarias do tipo Erlenmeyer 125 mL, foram descongelados os tubos Falcon® P50 e a biomassa foi inoculada a um volume equivalente a 10% do volume útil da vidraria, com uma concentração celular aproximada de 9,0 gL⁻¹ aferido por meio da densidade ótica e calculado com uma curva de calibração da concentração de *S. cerevisiae* gentilmente cedida pelo Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia executados procedimentos em triplicata, contendo 65 mL do meio de um hidrolisado de um pó de sabugo obtido no Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, outra triplicata contendo 65 mL de um meio de fermentação com quantidades equivalentes de glicose e xilose e uma triplicata com frutose ao invés de xilose, mantendo um ambiente separado por meio de algodão envolto com gaze, por um período de 8 horas a 30°C, com um agitador orbital Gyromax 737R, foi mantida a rotação de 50 rpm, durante a fermentação foi retirada uma alíquota de 1,5 mL de cada Erlenmeyer, nos intervalos de início (0 horas) e após 4, 7, 24 horas, transferindo-as para tubos tipo Eppendorf, centrifugadas a 10000 rpm, por 10 minutos (Pacheco, 2012).

Em sequência o sobrenadante foi separado da biomassa celular, o líquido foi guardado a 4°C para posterior análise de glicose, glicerol e etanol por cromatografia líquida no cromatógrafo da Shimadzu® (coluna HPX-87H, Bio-Rad), executando o processo mais duas vezes para a biomassa utilizando água de osmose, visando uma limpeza da mesma para analisar a densidade ótica (Silva 2020), uma segunda batelada de experimentos foi realizada, de forma semelhante a primeira, porém com a única diferença de haver 80 mL de meio em cada frasco tipo Erlenmeyer, reduzindo o espaço de trocas gasosas.

Com o auxílio de cálculos, foram determinados o rendimento da fermentação (Rf) e a eficiência da fermentação (Ef) sendo realizada através das Equações 4 e 5 (Santos, 2014).

$$Rf = \frac{\text{etanol produzido } (\frac{g}{L})}{\text{Açúcares redutores totais inicial } (\frac{g}{L})} \quad (4)$$

$$Ef = \frac{\text{rendimento real da fermentação}}{\text{rendimento teórico (0,51)}} \quad (5)$$

4.7.2. Ensaios de efeito de magnésio a cultura de *S. cerevisiae*

O processo de fermentação se sucedeu em frascos do tipo Erlenmeyers de 125mL, foram descongelados os tubos Falcon® P50 e a biomassa foi inoculada a um volume equivalente a 10% do volume útil da vidraria, com uma concentração celular aproximada de 6,0 gL⁻¹ contendo 65 mL de soluções de sacarose 200 g.L⁻¹, em triplicata, contendo diferentes concentrações de sulfato de magnésio (0.5 gL⁻¹, 1.0 gL⁻¹, 2.5 gL⁻¹) conservando a assepsia do ambiente por meio de algodão hidrofóbico envolto com gaze, por um período de 24 horas a 30°C, com um agitador, mantendo a rotação de 50 rpm, durante a fermentação foi removida uma alíquota de 1,5 mL de cada Erlenmeyer, nos intervalos de início (0 horas) e após 4, 7, 24 horas, sendo depositada em tubo tipo Eppendorf, centrifugadas a 10000 rpm, por 10 minutos, em seguida o sobrenadante foi coletado e guardado a 4°C para análise de glicose, glicerol e etanol por cromatografia líquida no cromatógrafo da Shimadzu® (coluna HPX-87H, Bio-Rad) (Monaco, 2007; Florêncio, 2013; Silva 2020).

4.8. Condução dos ensaios de fermentação etanólica com inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 em Biorreator

O biorreator empregado na fermentação Biorreator New Brunswick® Bio/Flo®/CelliGen® 115, o qual possui volume total de 2 L com volume útil de 1,5 L, conectado ao controlador New Brunswick®, no qual após a sua montagem foi colocado o meio sintético preparado contendo 13,41 g.L⁻¹ de glicose e 5,01 g.L⁻¹ de xilose, extrato de levedura (2,5 gL⁻¹), uréia (0,6 gL⁻¹), fosfato dipotássico (0,9 gL⁻¹), sulfato de magnésio heptahidratado (1,0 gL⁻¹), sulfato de zinco heptahidratado (0,03 gL⁻¹), sulfato de manganês heptahidratado (0,02 gL⁻¹) com pH ajustado para 5,5 com auxílio do pHmetro Tecnal® e ácido sulfúrico diluído, em seguida o biorreator foi

vedado todas as entradas com papel alumínio e gaze com algodão, colocado na autoclave por 121°C e 1 atm, em conjunto foi colocado o frasco mariotte, por um período de 30 minutos e deixado em repouso resfriando por 1 hora (Silva, 2020).

O volume do inóculo corresponde a 10% do volume útil, para a preparação do inóculo foi realizado o descongelamento à temperatura ambiente de todas as leveduras preservadas em tubo tipo Falcon® P50, sendo lavadas com água destilada dentro do fluxo laminar FilterFlux® Classe II A1/A2 e centrifugadas, em seguida toda a biomassa foi transferida para o frasco mariotte. Após a instalação do biorreator na bancada em conjunto com o controlador, como mostrado na Figura 10, foram inseridos os parâmetros, a rotação foi de 250 rpm, a temperatura de 30°C, um sensor de espuma e pH também foram posicionados no biorreator para possibilitar o monitoramento e controle do processo, após a estabilização da temperatura do biorreator, foram inoculados o equivalente a 9,0 gL⁻¹ de levedura (PACHECO, 2012; Veloso, 2023).

Figura 10 - Biorreator e Controlador New Brunswick®.



Fonte: Autores, 2024.

No decorrer do processo fermentativo, foi retirada uma alíquota de 5 mL de cada Erlenmeyer, nos intervalos de início (0 horas) e após 1, 2, 3, 4 e 5 horas, sendo depositada em tubo tipo Falcon® P15, centrifugadas a 7000 rpm, por 10 minutos, posteriormente tendo o sobrenadante armazenado a 4°C para análise de glicose, etanol e outros subprodutos por cromatografia líquida no cromatógrafo da Shimadzu® (coluna HPX-87H, Bio-Rad) (Silva, 2020).

4.9. Purificação e Aplicação

Após a fermentação, realizou-se uma centrifugação para sedimentar a biomassa no fundo dos tubos. Esse processo foi conduzido em uma centrífuga de chão da marca HITACHI® CR 22N. Nos ensaios em pequena escala, foram utilizados tubos Falcon®, enquanto nos ensaios em maior escala, foram utilizados frascos de 750 ml. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm, à temperatura de 20 graus.

Após a retirada das alíquotas para análise, o caldo fermentado foi destilado utilizando um sistema de destilação de bancada montado pelo grupo (Figura 11). O destilador era composto por uma manta de aquecimento, que aquecia o balão contendo o caldo fermentado, seguido de uma coluna de fracionamento. Um termômetro foi acoplado para a regulação da temperatura de ebulição, e, em seguida, um condensador conectado a um segundo balão volumétrico, onde o álcool gerado no processo era recuperado. O destilador foi operado a temperaturas próximas a 78°C, que é a temperatura de ebulição do etanol. Este processo foi repetido até que todos os caldos de fermentação, tanto dos testes em pequena escala quanto dos de maior escala, fossem destilados. Ao final do processo, o etanol obtido foi avaliado (coluna *Aminex HPX-87H*), fase móvel ácido sulfúrico 0,005 mol.L-1, vazão de 0,6 mL/min, temperatura do forno a 60°C e detector de índice de refração RID-10A, em cromatógrafo Shimadzu®).

Figura 11 - Sistema de destilação do etanol.



Fonte: Autores, 2024.

Ao final do processo de destilação, foram adicionados 1,5 gramas de carvão ativado em 50 mL das amostras em tubos Falcon®, os quais foram submetidos à agitação mecânica em vortex por 5 ciclos de 5 minutos cada. Após essa etapa, os tubos Falcon® foram centrifugados HITACHI® CR 22N por 10 minutos a 7000 RPM para a separação do carvão ativado e das impurezas adsorvidas.

A partir do produto obtido, foi produzido álcool em gel. Primeiramente, a graduação do etanol foi verificada utilizando um densímetro. Para essa análise, foram adicionados 100 mL de etanol em uma proveta de 100 mL. Em seguida, um densímetro foi cuidadosamente inserido na proveta, garantindo que não houvesse contato com o fundo ou as laterais da vidraria. Com o densímetro flutuando livremente, foi possível verificar a graduação alcoólica do etanol obtido. Para se obter a graduação alcoólica desejada, foi necessário calcular a relação entre as concentrações e volumes iniciais e finais. Essa relação foi determinada para uma amostra de 100 mL, utilizando a Equação 6, onde $C_{inicial}$ representa a graduação alcoólica encontrada pelo densímetro, $V_{inicial}$ é a quantidade de água destilada (mL) que deve ser adicionada, C_{final} é a graduação alcoólica desejada, e V_{final} é o volume total de etanol na proveta.

$$C_{inicial} \times V_{final} = C_{final} \times (V_{inicial} + V_{final}) \quad (6)$$

Para preparar uma amostra de 50 mL de álcool em gel, foram adicionados 0,5 gramas de Ácido Poliacrílico Carbomer (Carbopol®), que atua como agente gelificante, e 3 gotas de trietanolamina, agente de correção de pH. A mistura foi dissolvida com auxílio de agitação mecânica. Por fim, foi realizada a conferência do pH e da viscosidade do álcool em gel obtido. A viscosidade foi medida pelo reômetro (Brookfield® - DV - III Ultra), utilizando o *Spendel* 25, enquanto o pH foi mensurado pelo medidor de pH da bancada Tecnal®.

4.10. Tratamento de resíduos gerados

Em relação ao tratamento de resíduos, foram empregados métodos de determinação de alguns parâmetros relevantes de acordo com a legislação brasileira vigente para reutilização e lançamento de efluentes, como teor de proteínas, demanda química de oxigênio (DQO) e determinação de sólidos totais, voláteis e fixos.

4.10.1. Determinação de sólidos

Para a realização desse ensaio foram utilizadas cápsulas de porcelana de 100 mL que foram lavadas e calcinadas em mufla a 550°C ($\pm 50^\circ\text{C}$) por 15 minutos. Após o resfriamento até cerca de 150°C, as cápsulas foram levadas para estufa a 105°C por alguns minutos até estabilização da temperatura, então as cápsulas foram transferidas para um dessecador com sílica para resfriamento sem absorção de umidade atmosférica até a temperatura ambiente. É relevante pontuar que foram utilizadas luvas para altas temperaturas e pinça metálica para manipulação dos equipamentos e materiais em altas temperaturas.

Em sequência, as massas das cápsulas vazias (M_0) foram determinadas. As amostras utilizadas foram o resíduo da destilação, que corresponde ao caldo fermentativo com hidrolisado de sabugo, e o resíduo do pré-tratamento ácido, elencando que ambos foram filtrados a vácuo antes da utilização. Adicionou-se 10 mL de resíduo da fermentação e 20 mL de resíduo ácido das soluções nas cápsulas e mantidas em estufa a 103°C para evaporar a água por 48 horas. Após esse período, as cápsulas foram colocadas em dessecador até estabilização da temperatura e foi determinada a massa das cápsulas com os sólidos (M_1). A partir da Equação 7 abaixo, é possível calcular a concentração de sólidos totais, em mg/L, nas amostras.

$$\text{mg/L sólidos totais} = \frac{(M_1 - M_0) \cdot g \cdot 1000}{\text{Volume amostra (L)}} \quad (7)$$

Em seguida, as cápsulas com amostra seca foram calcinadas em mufla a 550°C ($\pm 50^\circ\text{C}$) por duas horas, e resfriadas até cerca de 105°C. Então as cápsulas foram transferidas para um dessecador para atingir a temperatura ambiente sem absorção de umidade atmosférica. Então em balança analítica, foi determinada a massa M_2 . Para calcular a concentração de sólidos voláteis foi utilizada a Equação 8 e para o cálculo de sólidos fixos foi utilizada a Equação 9, apresentada abaixo.

$$\text{mg/L sólidos totais voláteis} = \frac{(M_1 - M_2) \cdot g \cdot 1000}{\text{Volume amostra (L)}} \quad (8)$$

$$\text{mg/L sólidos totais fixos} = \frac{(M_2 - M_3) \cdot g \cdot 1000}{\text{Volume amostra (L)}} \quad (9)$$

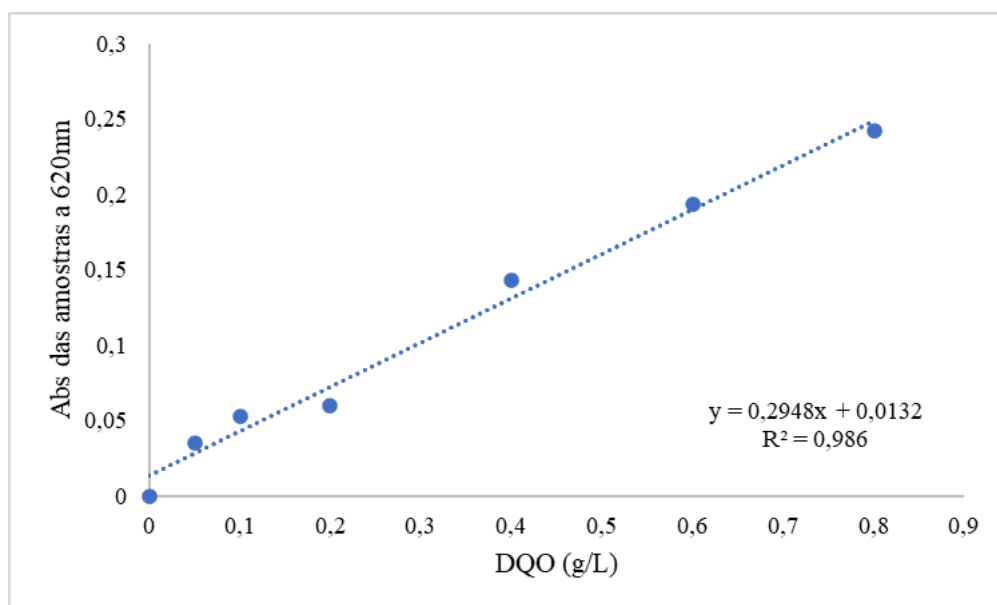
Além dos cálculos, o pH das amostras foi medido por pHmêtro digital (Tecnal®). Esse ensaio foi realizado em duplicata.

4.10.2. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Para esse experimento, foram preparadas três soluções, sendo: solução de sulfato de prata em ácido sulfúrico concentrado (10,12 g de Ag_2SO_4 por litro de H_2SO_4); solução de digestão composta por dicromato de potássio (10,216 g/L), sulfato de mercúrio (33,3 g/L) e ácido sulfúrico (167 mL/L), diluídos em água destilada e solução de hidrogenoftalato de potássio (KHP) que funciona como padrão primário, visto que 1,000 mg de KHP apresenta DQO de 1,176 mg de O_2 , teoricamente.

A curva analítica realizada com a solução de KHP foi fornecida pelo Professor Doutor Guilherme Peixoto e está demonstrada abaixo no Gráfico 1, sendo que o procedimento realizado foi o mesmo empregado e descrito em seguida, apresentando R^2 .

Gráfico 1- Curva analítica de DQO em solução de hidrogenoftalato de potássio.



Fonte: Fornecida pelo Professor Doutor Guilherme Peixoto, 2024.

Todas as etapas deste ensaio foram realizadas com luvas nitrílicas para evitar acidentes e contato direto da pele com as soluções, além de que as soluções produzidas foram manuseadas apenas em capela de exaustão.

Para a digestão, inicialmente o digestor foi ligado e sua temperatura foi programada para 150°C . Foram utilizadas como amostras do resíduo da destilação e resíduo do pré-tratamento ácido, como na Seção 4.10.1, sendo filtradas a vácuo antes da utilização. A seguir, em capela de exaustão, adicionou-se 2,5 mL da amostra, caso esteja entre 50 e 800 mg/L de DQO, com auxílio de pipeta automática

em tubo de ensaio de 12 mL (Hach®), para então adicionar 1,5 mL da solução de digestão e 3,5 mL da solução de ácido sulfúrico e sulfato de prata ao tubo. Então foi fechado hermeticamente e agitado em vortex. O ensaio foi realizado em duplicata, assim como o branco que foi realizado da mesma forma com 2,5 mL água destilada e demais reagentes.

Após isso, os tubos foram levados para o digestor a 150°C e foram mantidos por 120 minutos cobertos com papel alumínio evitando interferência da luz no ensaio. O tempo foi programado no digestor e ao final os tubos foram resfriados em local escuro para leitura. A leitura de absorvância foi realizada com espectrofotômetro (Bel Photonics®) a 620 nm com cubetas de vidro. Inicialmente, mediu-se o branco e as outras amostras tiveram absorvância medidas, possibilitando o cálculo da demanda química de oxigênio através da curva analítica supracitada.

4.10.3. Determinação de nitrogênio sólidos pelo método de Kjeldahl

Inicialmente, realizou-se a padronização da solução de ácido clorídrico. Para isso, adicionou-se uma massa de Na₂CO₃ suficiente para consumir 15 ml do HCl, conforme descrito na Equação 10 abaixo.



Além disso, preparou-se uma solução saturada de ácido bórico, dissolvendo 30 gramas de ácido em 500 ml de água destilada. Para a preparação do indicador vermelho de metila, dissolveu-se 1 grama do composto em 60 ml de álcool e, em seguida, em 40 ml de água destilada. Objetivando preparar a mistura indicadora, composta por vermelho de metila e azul de metileno (2:1) a uma concentração de 0,02%, os reagentes também foram diluídos nas mesmas proporções anteriores de água e álcool.

Foi misturado o carbonato de sódio com 25 ml de água destilada e algumas gotas do indicador vermelho de metila em um erlenmeyer de 250 ml. Utilizando um bureta, realizou-se a titulação com HCl 0,02N, permitindo, em seguida, calcular a normalidade do ácido e o fator de correção.

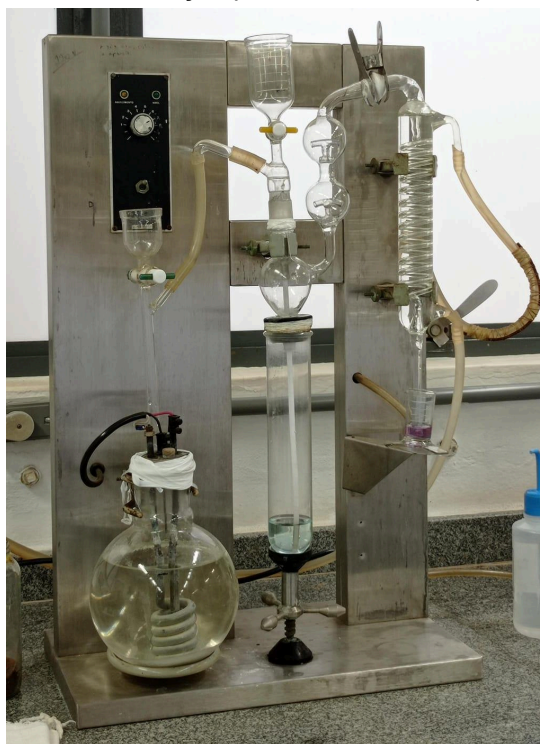
Previamente, pesaram-se 100 mg da amostra em uma balança analítica e adicionaram-se a um tubo de ensaio juntamente com 1 grama do catalisador K₂SO₄

+ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4:1) e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, dentro da capela. Também foi preparado um branco, no qual a amostra estava ausente. Os tubos foram colocados no digestor, aumentando gradualmente a temperatura até que o líquido se tornasse translúcido e não houvesse resíduos nas paredes do recipiente, o que pode levar de 2 a 4 horas. Após o término, aguardou-se o resfriamento da amostra e procedeu-se à transferência para um tubo de destilação.

Sob o condensador, colocou-se uma proveta contendo 500 ml de ácido bórico e algumas gotas da mistura indicadora. No tubo da amostra, adicionaram-se também 10 ml de solução de NaOH (60%), seguido de aquecimento e posterior destilação até que todo o nitrogênio fosse transferido para a vidraria contendo o ácido bórico, sendo possível observar o equipamento na Figura 12 abaixo.

Por fim, realizou-se o processo de titulação, transferindo o destilado para um erlenmeyer de 250 ml e posicionando-o abaixo da bureta contendo ácido clorídrico 0,02N. Anotou-se o volume necessário para observar a mudança de cor.

Figura 12 - Equipamento de destilação por arraste utilizado para o método de Kjeldahl.



Fonte: Autores, 2024.

4.10.4. Determinação de proteínas em soluções pelo método de Bradford

A curva analítica realizada com uma solução de Soro Albumina Bovina foi fornecida pelos docentes, sendo que a Equação 11 corresponde a equação da reta.

$$Y = (0,370 \cdot X + 0,0156) \quad (11)$$

Para a realização do experimento, foram adicionados 800 µL da amostra e 800 µL de reagente de Bradford aos tubos de ensaio, pontuando que as amostras empregadas foram referentes ao resíduo da destilação e resíduo do pré-tratamento ácido, como nas seções 4.10.1 e 4.10.2, diluindo em 10x e 20x ambos.

Posteriormente, os tubos foram agitados vigorosamente com auxílio do vórtex e mantidos em repouso durante 5 minutos. A seguir, as amostras devem ser submetidas a leitura em espectrofotômetro (Bel Photonics®) a 595 nm com cubetas limpas. Com os dados de absorvância é possível calcular a concentração de proteínas através da equação da reta supracitada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Pré-tratamento ácido

5.1.1. Teor de umidade do sabugo de milho

O teor de umidade do sabugo de milho foi medido tanto do sabugo *in natura*, quanto do sabugo após pré-tratamento e após hidrólise enzimática utilizando a metodologia do item 4.5.1. A amostra do sabugo recém moído (*in natura*) teve o teor medido apenas uma vez, para que fosse possível identificar o quanto de sabugo seria necessário para o pré-tratamento, enquanto a amostra do pré-tratamento e da hidrólise foram feitas em triplicata. Ademais, após a centrifugação do hidrolisado, obteve-se também uma massa sólida, a qual também teve seu teor de umidade verificado. Os valores encontrados estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Teor de umidade encontrado para as amostras de sabugo.

Teor de umidade (%)	In natura	Pré-tratado	Hidrolisado	Massa do hidrolisado
Amostra 1	16,16	7,37	4,76	4,20
Amostra 2	-	6,92	5,37	3,88
Amostra 3	-	6,72	5,99	3,68
Média	-	7,00	5,37	3,92
Desvio Padrão	-	0,33	0,615	0,262

Fonte: Autores, 2024.

O valor para o sabugo de milho *in natura* ultrapassa os 10% recomendados pela literatura, valores acima deste podem acarretar em contaminação bacteriana que podem produzir substâncias não desejáveis. Esse valor pode ser resultado da retirada antecipada do sabugo da estufa, de uma temperatura mais baixa da mesma, e da espera para utilização da balança, fazendo com que o sabugo absorvesse umidade do ambiente.

Os valores médios obtidos para as outras amostras de pré- tratamento e de hidrolisado estão dentro do valor de 10%, por isso, são valores aceitáveis. Santos (2014) determinou o teor de umidade do sabugo de milho após pré-tratamento com 0,5% de H₂SO₄ e obteve uma média de 6,1±0,3, o qual é semelhante ao obtido no presente trabalho.

5.1.2. Rendimento mássico após Pré-tratamento

Durante a realização do pré-tratamento ácido em agitador orbital Amerex®, um dos erlenmeyers de 1L quebrou, por isso, o valor da massa adicionado a esse erlenmeyer para a realização do processo foi retirado do valor de massa inicial para não comprometer o valor final e conseqüentemente o valor do rendimento. Todas as massas são em relação à base seca.

O valor de rendimento mássico do pré-tratamento está demonstrado na Tabela 3 utilizando a Equação 2.

Tabela 3 - Valor inicial e final do pré-tratamento com o valor calculado de rendimento.

Massa inicial (g)	Massa final (g)	Rendimento mássico (%)
290	219,63	75,73

Fonte: Autores, 2024.

O resultado encontrado foi satisfatório, indicando que o pré-tratamento foi eficaz para o sabugo de milho.

Antunes *et al.* (2014) realizou pré-tratamento com diversos ácidos, como ácido clorídrico, ácido sulfúrico em albedo de laranja em diversas concentrações por 15 minutos. Com 0,5% de ácido sulfúrico, por exemplo, o rendimento encontrado foi de 49,66%. Silva (2009), pré-tratou bagaço de cana de açúcar com 1% de ácido sulfúrico, por 10 min a 120 °C e obteve 56,8% de rendimento mássico após o processo de pré-tratamento. Do Prado Marinho *et al.* (2020) observou que nas

condições de 0,3M de ácido sulfúrico, 60 minutos e 100 °C obteve-se um rendimento de 70%.

Com os valores de rendimento obtidos nos estudos citados acima, o rendimento de Do Prado Marinho *et al.* (2020) foi bem próximo ao obtido no presente trabalho. Sendo assim, é possível sugerir que a variável tempo apresenta bastante influência sobre o rendimento final do pré-tratamento, juntamente a uma temperatura mais baixa, não ocasionando a liberação de compostos inibitórios ou que prejudiquem o rendimento. Santos-Rocha *et al.* (2017), por exemplo, encontrou em seus estudos que o aumento da temperatura fez com que o rendimento mássico de suas amostras de sabugo de milho diminuíssem de 50,4% para 41,5%.

5.2. Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática tinha como planejamento a sua realização de forma estéril, porém problemas surgiram com o motor do impelidor, o que levou a abertura do biorreator em ambiente não estéril. Com isso, utilizou-se Azida de Sódio 99,5% diluída 100 vezes, a qual é um antifúngico, haja visto que o biorreator ficaria fechado por 3 dias e poderia haver alguma contaminação.

Ao final do processo de hidrólise e análise em HPLC, os valores encontrados para Açúcares Redutores Totais (ART) foi de 19,26 g/L, sendo 13,42 g/L de glicose e 5,84 g/L de xilose, os quais estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores encontrados para os Açúcares Redutores Totais (ART).

ART (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)
19,26	13,42	5,84

Fonte: Autores, 2024.

Como não houve a determinação do teor de celulose após o pré-tratamento, o cálculo de conversão enzimática foi feito a partir de valores encontrados na literatura para essa variável. Godinho *et al.* (2019) ao utilizar um pré-tratamento oxidativo com peróxido de hidrogênio à 80 °C no sabugo, obteve 53,85% de celulose. A porcentagem de glicose encontrada se dá pelo cálculo simples de quanto o seu valor corresponde em 100% em relação à toda a massa hidrolisada, com isso, utilizando a Equação 2 do item 4.6, a conversão enzimática foi calculada e está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de Celulose, Glicose e Conversão Enzimática calculados em porcentagem.

Celulose após pré-tratamento oxidativo (%)	Glicose obtida após hidrólise enzimática (%)	Conversão Enzimática (%)
53,85	6,8	11,36

Fonte: Autores, 2024.

O resultado encontrado para a etapa de hidrólise enzimática não é satisfatório, haja visto a baixa conversão de celulose em glicose calculada. De Carli (2011) ao realizar hidrólise enzimática em batelada, assim como o presente trabalho, durante 30h obteve 60 g/L de glicose e uma taxa de conversão de quase 80%. Outros estudos também demonstram melhores conversões, como Santos-Rocha *et al.* (2017) que obteve 12,4 g/L de ART em seu hidrolisado de sabugo pré-tratado a 195 °C por 10 minutos e 47,75% de conversão enzimática.

Com isso, algumas adversidades que ocorreram durante a execução podem ter sido responsáveis pela baixa eficiência dessa etapa, como por exemplo o tamanho das partículas de sabugo utilizadas, como representado na Figura 8 supracitada, o que pode ter acarretado em uma menor superfície de contato entre o sabugo e a enzima, não ocorrendo a devida conversão da celulose, aliado ao tamanho da enzima, a qual pode não ter conseguido chegar ao substrato. Além disso, o sabugo de milho é um material altamente esponjoso, segundo Silva (2018) o sabugo por inteiro tem a capacidade física de 369% de absorção de água e ao final do processo, observou-se que a mistura não tornou-se líquida, como demonstra a Figura 13, algo que é comum durante o processo de hidrólise.

Figura 13 - Fotografia tirada ao final das 72h da etapa de hidrólise.

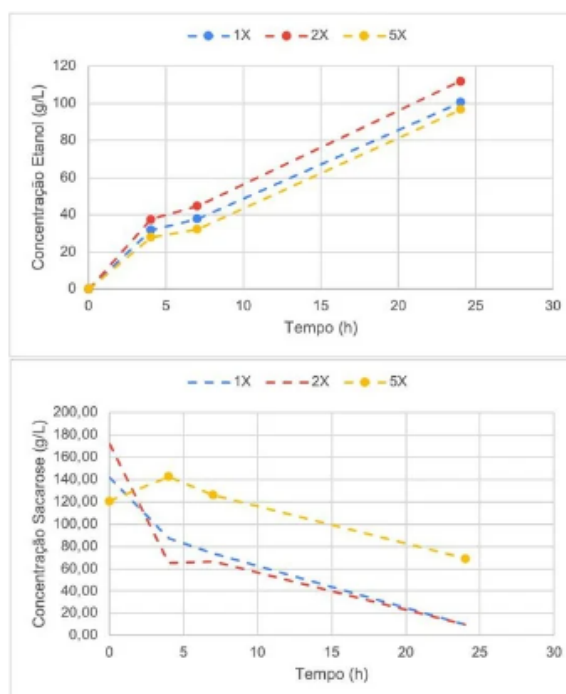
Fonte: Autores, 2024

5.3. Fermentação

5.3.1. Fermentação utilizando diferentes concentrações de magnésio

Após a realização do ensaio de fermentação com os três meios de cultura contendo concentrações diferentes de sulfato de magnésio - 0.5 gL^{-1} , 1.0 gL^{-1} , 2.5 gL^{-1} - para facilitar as observações as concentrações são identificadas como 1X, 2X e 5X. Ao fim da fermentação foi possível visualizar a produção de etanol, assim como o consumo de glicose e frutose decorrente da degradação como mostrado no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Representação de cima para baixo da produção de etanol, consumo de sacarose.



Fonte: Autores, 2024.

A partir de uma análise é avaliado que a cinética da fermentação alcoólica é obedecida, visto que a concentração de etanol aumenta consideravelmente, a concentração de glicose e frutose (açúcares redutores) diminui com o passar do tempo, a partir da equação 12 de açúcar consumido (S) que considera as concentrações inicial (S_0) e final (S_f) e a quantidade de etanol produzido (P) mostrado na equação 13, foi possível determinar o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) exibido na equação 14. Por fim, com o rendimento teórico (eficiência de fermentação - E_f) decorrente da equação 15 de Gay-Lussac, utilizando

o fator de conversão de sacarose em glicose e frutose é calculado os valores (Montiel, 2022).

$$S = S_o - S_f \quad (12)$$

$$P = P_f - P_i \quad (13)$$

$$Y_{\frac{p}{s}} = \frac{P}{S} \quad (14)$$

$$Ef = \left(\frac{Y_{\frac{p}{s}}}{0,511} \right) * 100\% \quad (15)$$

Pf = Concentração final de etanol (gL⁻¹)

Pi = Concentração inicial de etanol (gL⁻¹)

A partir das contas é estipulado as eficiências fermentativas para cada concentração de magnésio, como mostrado na Tabela 6.

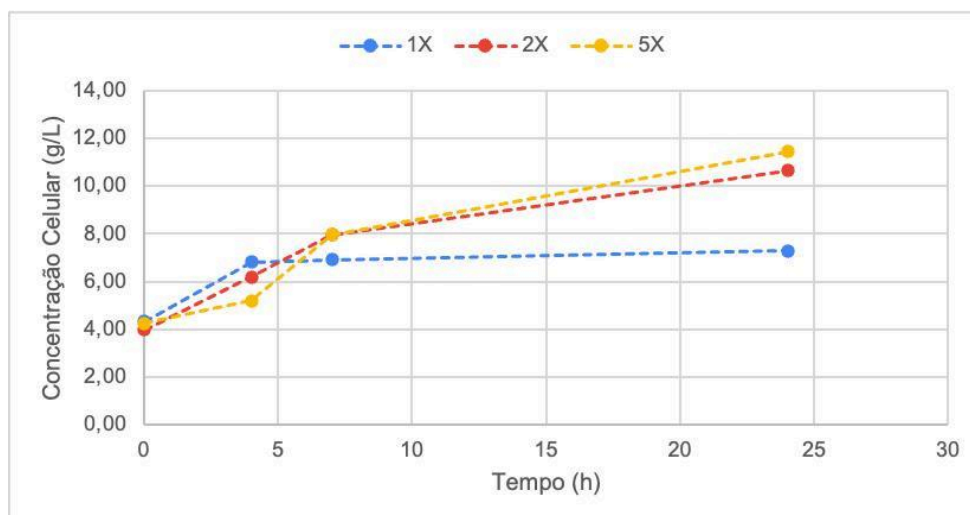
Tabela 6 - Eficiência de conversão para as diferenças de magnésio em cada cultura.

	Concentrações de sulfato de magnésio (gL ⁻¹)		
	0,5	1,0	2,5
Eficiência Fermentativa (%)	93,4	98,2	89,9

Fonte: Autores, 2024.

Ademais, foi possível observar a densidade óptica e a viabilidade de cada concentração para determinar se a concentração de magnésio teve influência no crescimento celular e fermentação, mostrados no Gráfico 3 e Tabela 7.

Gráfico 3 - Crescimento celular durante o período de fermentação.



Fonte: Autores, 2024.

Tabela 7 - Viabilidade média em cada concentração de magnésio ao final do ensaio.

	Concentrações de sulfato de magnésio (gL⁻¹)		
	0,5	1,0	2,5
Viabilidade média (%)	80,4±5,6	95,6±0,12	74,3±0,62

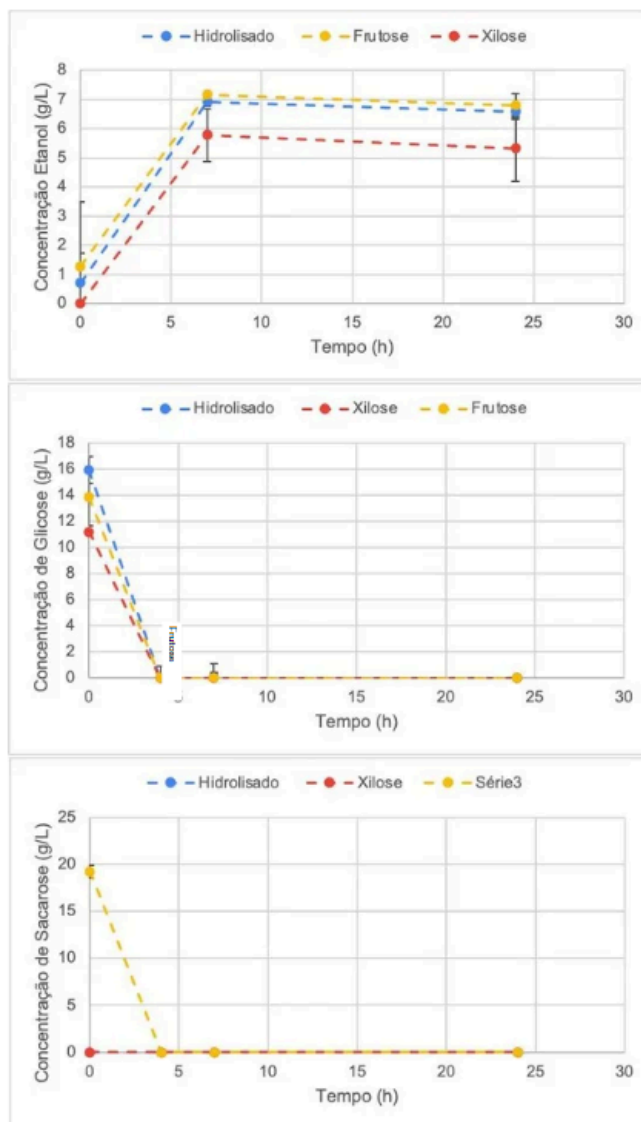
Fonte: Autores, 2024.

Logo, a partir dos resultados, todas as culturas apresentaram uma boa conversão de sacarose em etanol, todavia é possível observar o efeito do magnésio em sua concentração ótima quando adicionado 1,0 gL⁻¹, ou seja, na concentração 2X, pois a viabilidade, densidade celular e eficiência de conversão se apresentaram no maior valor para os três parâmetros.

5.3.2. Determinação da produção de etanol em Erlenmeyer com diferentes meios de fermentação

Logo após a análise dos pontos da produção de etanol utilizando a coluna HPX-87H, Bio-Rad no HPLC, com diluições de 10 e 20 vezes, foi obtido nos Gráficos 4, 5 e 6, das quais foram possíveis analisar como ocorreu a fermentação de cada um dos meios.

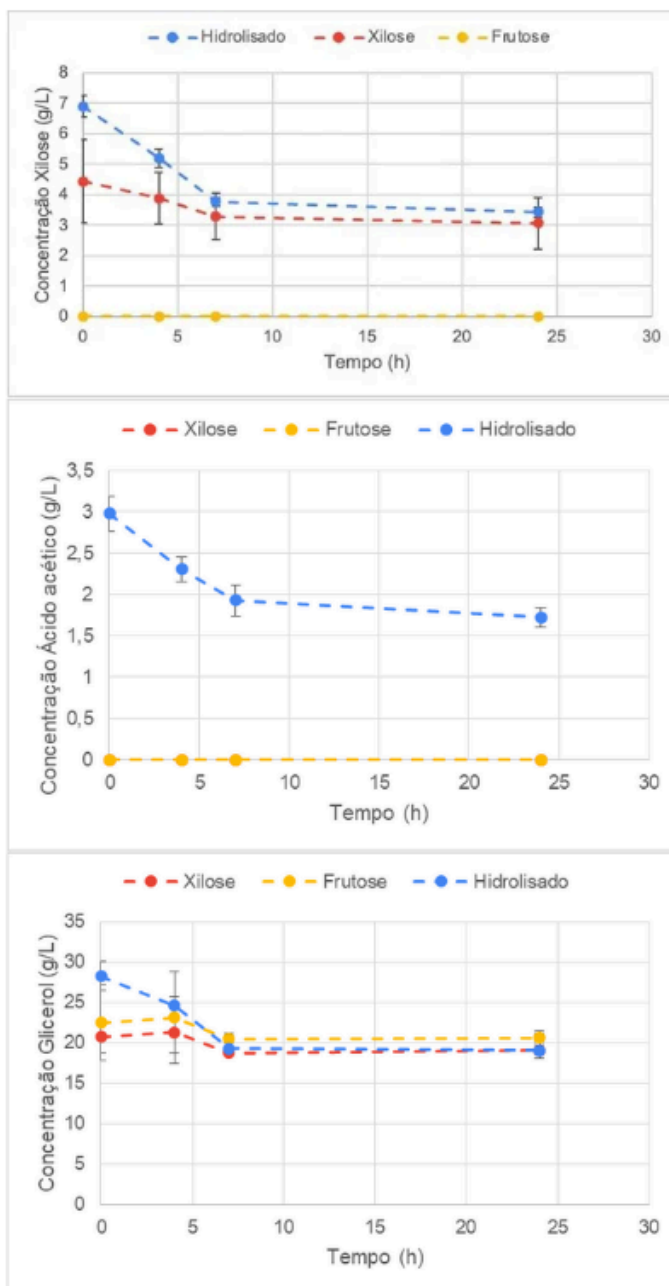
Gráfico 4 - Representação de cima para baixo da produção de etanol, consumo de glicose e consumo de frutose.



Fonte: Autores, 2024.

Os açúcares redutores com vias metabólicas preferenciais foram consumidos nas primeiras 4 horas de experimento, mostrando que a levedura conseguiu processar de forma significativa e converter em etanol, a concentração de etanol se manteve crescente nas primeiras 7 horas, porém apresentaram perdas no processo, diminuindo a concentração de álcool nas próximas horas, isso também ocorreu no trabalho de Duval (2011), onde as perdas podem estar associadas a evaporação do etanol, erros nos métodos analíticos e até mesmo imprecisão das ferramentas para preparo da amostra, como pipeta e proveta descalibrada.

Gráfico 5 - Representação, de cima para baixo, do consumo de xilose, variação na concentração de glicerol, variação na concentração de ácido acético.

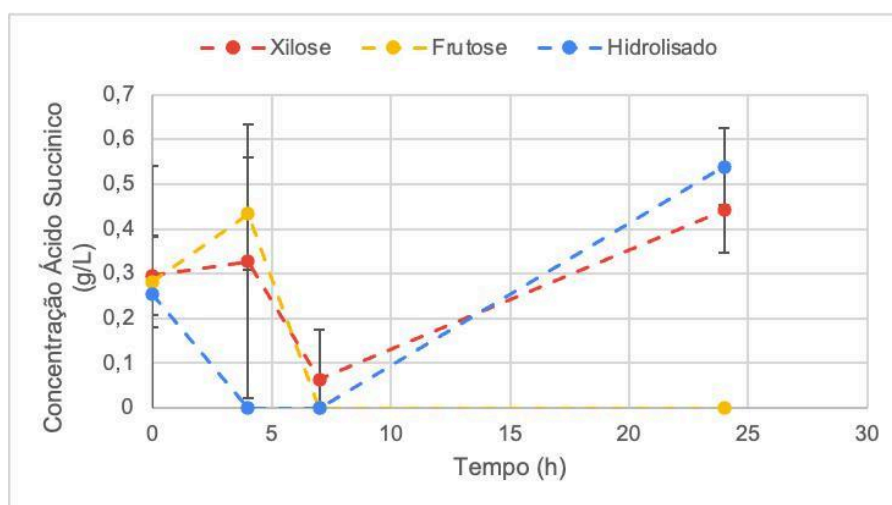


Fonte: Autores, 2024.

Seguindo a análise pode ser observado um consumo consideravelmente alto de xilose, porém por mais que a *S. cerevisiae* não seja uma potente consumidora de xilose em sua forma selvagem, há vários relatos de cepas modificadas para realizar o consumo desse açúcar, tal qual a SA-1 relatada no trabalho da Petrin (2021) que conseguiu consumir mais de 30 gL⁻¹, produzindo etanol. O consumo de glicerol e ácidos orgânicos como ácido acético também já foi relatado em diversos trabalhos como descrito no estudo realizado por Raab *et al* (2010), obedecendo uma cinética

de fermentação alcoólica da levedura, que não só é conhecida por produzir esses compostos como produto, mas também realiza o consumo em cepas industriais modificadas ou cultivadas para essa finalidade. A respeito da concentração inicial de glicerol observada pode ser relacionada a uma quantidade que ficou associada a biomassa, já o ácido acético pode ter sido um resquício vinculado ao hidrolisado ou uma contaminação proveniente das fases de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

Gráfico 6 - Representação da variação da concentração de ácido succínico durante a fermentação.



Fonte: Autores, 2024.

O ácido succínico é um dos subprodutos mais característicos da fermentação alcoólica da *Saccharomyces cerevisiae*, porém assim como a xilose, não possui relatos de um consumo caso não seja modificada ou selecionada para tal. Todavia um trabalho desenvolvido por Rendulic *et al* (2024), descreve a via metabólica de produção de ácido succínico a partir de glicerol e também uma desidrogenase que possibilita a via metabólica contrária para o consumo do ac. succínico e liberação de glicerol. Assim como o glicerol, o ácido succínico também pode ser um resquício presente na biomassa, o qual aumenta a concentração por meio de uma fermentação de glicerol e diminuição relacionada à formação da glicerina.

A partir das contas mostradas no item 5.3.1 foi estimado as eficiências fermentativas para cada meio, como mostrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Eficiência de conversão para os diferentes meios de fermentação.

	Meios de fermentação		
	Hidrolisado	Xilose	Frutose
Eficiência Fermentativa (%)	84,9	90,0	72,9

Fonte: Autores, 2024.

Ademais, foi avaliado a viabilidade de cada concentração para determinar se os meios de fermentação obtiveram influência sobre o levedo, como exibido na Tabela 9.

Tabela 9 - Viabilidade média nos diferentes meios de fermentação.

	Meios de fermentação		
	Hidrolisado	Xilose	Frutose
Viabilidade média (%)	84,9±0,3	83,7±2,2	70,8±8,4

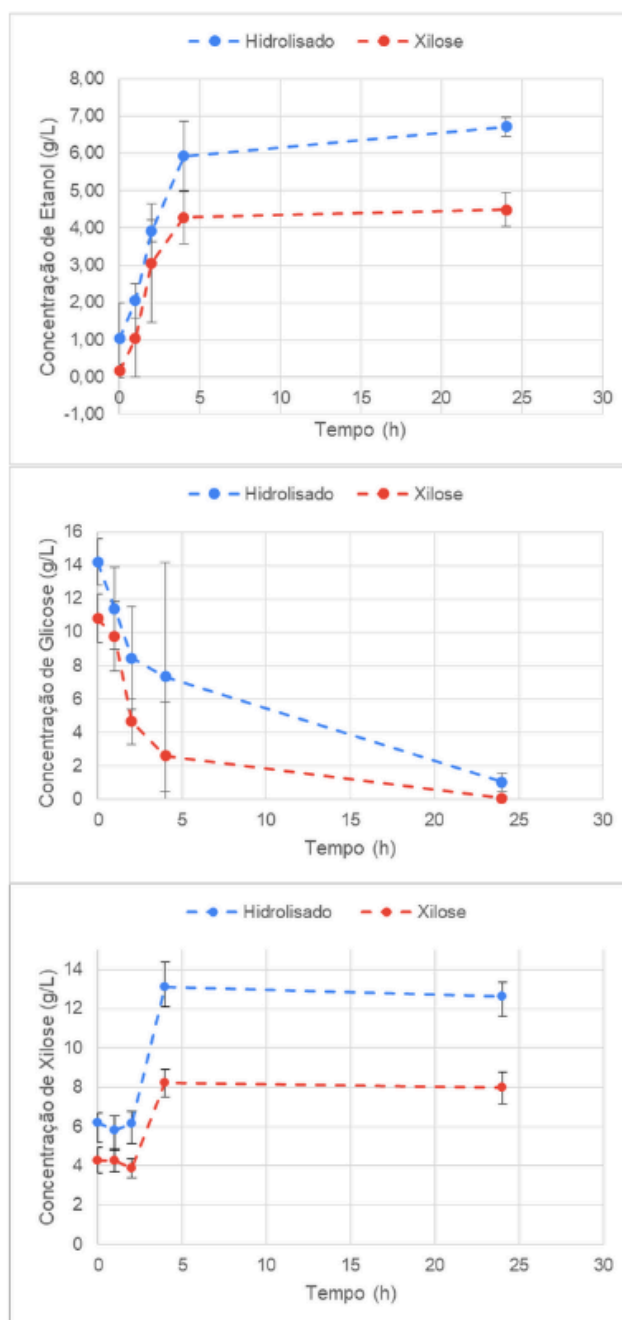
Fonte: Autores, 2024.

Através da análise estatística ANOVA com os resultados da fermentação e da viabilidade do levedo entre os diferentes meios de fermentação, o meio composto pelo hidrolisado de sabugo de milho e o meio sintético composto por uma mistura de xilose e glicose não apresentam diferença estatística significativa, ou seja, os meios são semelhantes.

5.3.2.1 Fermentação empregando maiores volumes

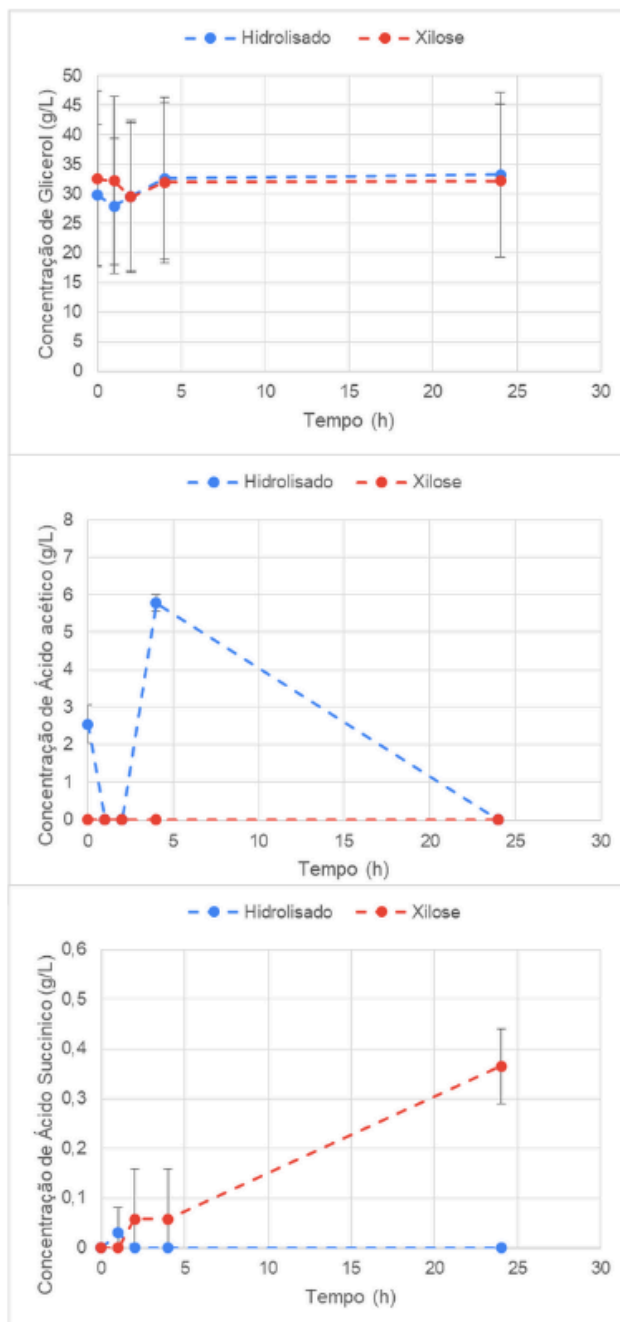
Sabendo que os meios de fermentação contendo hidrolisado e xilose são equivalentes do ponto de vista estatístico, foi realizada a fermentação com maior volume, diminuindo o espaço para trocas gasosas “headspace” do frasco tipo Erlenmeyer. Após o fim da fermentação, foi possível observar os seguintes resultados expressos nas Gráfico 7 e 8.

Gráfico 7 - Representação de cima para baixo da produção de etanol, consumo de glicose e consumo de xilose.



Fonte: Autores, 2024.

Gráfico 8 - Representação, de cima para baixo, variação na concentração de glicerol, variação na concentração de ácido acético, produção de ácido succínico.



Fonte: Autores, 2024.

A cinética da fermentação alcoólica foi obedecida para a maioria dos compostos, visualizando um consumo mais lento de glicose, assim como uma constância maior na concentração de etanol e glicerol, ocorrendo menos perdas do primeiro. Todavia houveram algumas inconsistências a serem observadas, como a produção constante de ácido succínico somente no meio com xilose e o ácido

acético sendo produzido apenas no meio com hidrolisado, por fim houve um aumento inesperado na concentração de xilose em ambos os meios. Como se sucederam muitas variações com a cinética de fermentação, há hipótese mais provável está relacionada a erros analíticos, principalmente de contaminação em relação aos ácidos, diluição incorreta ou vial com impurezas para o HPLC e imprecisão instrumental.

Contudo, com base nas contas mostradas no item 5.3.1 foi calculado as eficiências fermentativas para cada meio, não apresentando uma diferença significativa entre os dois meios, como mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 - Eficiência Fermentativa para os diferentes meios de fermentação.

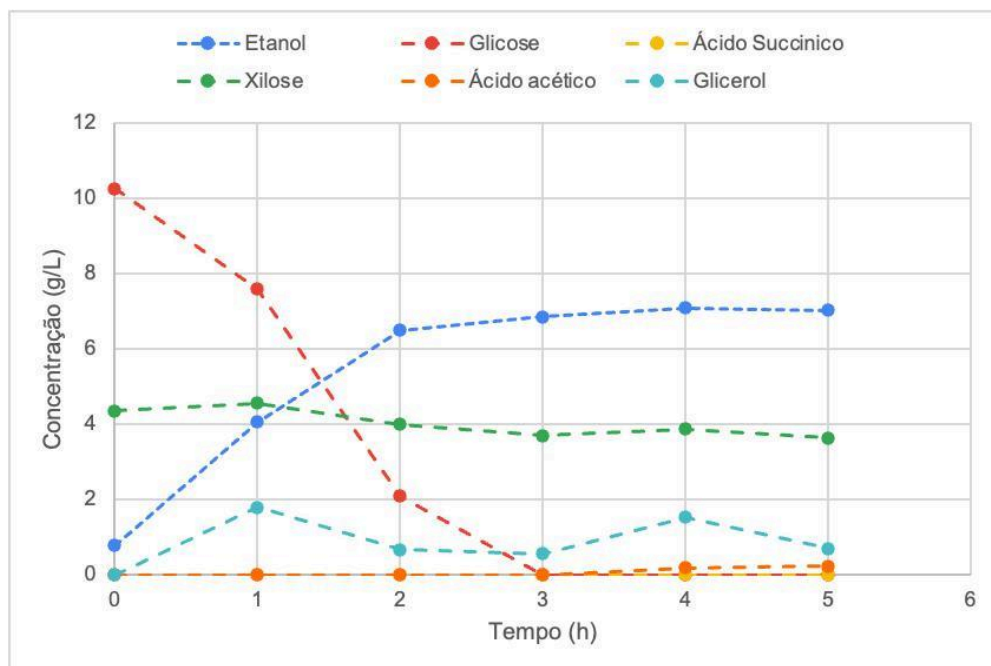
	Meios de fermentação	
	Hidrolisado	Xilose
Eficiência Fermentativa (%)	92,7	81,4

Fonte: Autores, 2024.

5.3.3. Avaliação da fermentação em Biorreator

Com a execução da fermentação utilizando o biorreator e empregando o meio de xilose e glicose, foram obtidos os dados, podendo montar o seguinte perfil com os dados associados às concentrações de cada substância envolvida, como mostrado no Gráfico 9.

Gráfico 9 - Representação dos subprodutos formados durante a fermentação em decorrência dos açúcares consumidos.



Fonte: Autores, 2024.

No gráfico é possível visualizar a cinética da fermentação alcoólica ideal, assemelhando-se aos resultados obtidos no item 5.2, a glicose foi toda consumida dentro de um intervalo de 4 horas, a produção de etanol atingiu o seu pico no mesmo período e permaneceu constante 1 hora após, a xilose foi pouco consumida, mas ressalta a capacidade da cepa PE-2 de utilizar essa fonte de carbono, a glicerina apresentou uma variação pequena e os ácidos acético e succínico foram produzidos em quantidades mínimas. Utilizando as equações presentes no item 5.3.1 foi estimado a eficiência fermentativa de açúcar em etanol, como mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Eficiência Fermentativa em etanol realizada no biorreator.

Eficiência fermentativa (%)	97,4
------------------------------------	------

Fonte: Autores, 2024.

Ao comparar essa eficiência com outras fermentações com diferentes materiais como fonte de carbono, é perceptível a melhor conversão de etanol a partir do hidrolisado do sabugo de milho, a levedura PE-2 pura avaliada no trabalho de Cherubin (2003) apresentou rendimento máximo de 90,6% de conversão de glicose em etanol, outro experimento, executado por Veloso (2023) demonstrou uma eficiência entre 92% e 93%.

5.4. Purificação e Aplicação

Primeiramente foi realizada a centrifugação, onde a biomassa foi separada e posteriormente utilizada para o tratamento de resíduos. O líquido resultante foi submetido a um processo de destilação com o objetivo de obter etanol.

Após a montagem do sistema de destilação de bancada, iniciaram-se as destilações dos meios de fermentação. Primeiramente, foram destilados 60 ml de álcool 70% (INPM) para garantir o correto funcionamento do equipamento. Após essa destilação teste, foram realizadas mais oito destilações com os meios provenientes de todos os testes de fermentação. Na Tabela 12 estão expressos os volumes adicionados, o meio de fermentação de onde provinham, volume final de etanol obtido e a porcentagem final de etanol.

Tabela 12 - Volumes iniciais e finais das destilações dos meios de fermentação.

Meio de fermentação	Volume de vinhaça (ml)	Volume final de etanol obtido (ml)	Porcentagem final de etanol obtido (%)
Meio com sacarose	1017,5	65	6,3882
Hidrolisado	540	5	0,9259
Meio do biorreator	1285	5,5	0,4280

Fonte: Autores, 2024.

Foi medida a graduação alcoólica do etanol obtido, encontrando-se um valor de 82 graus GL. Como se desejava obter um álcool com 70% de concentração (INPM), equivalente a 77 graus GL, foi necessário calcular a relação entre as concentrações e volumes iniciais e finais para atingir o teor de etanol desejado. Essa relação foi determinada para uma amostra de 100 mL, utilizando a Equação 5. Para ajustar a concentração para 70% INPM, foi adicionado 17,14 ml de água destilada, conforme os cálculos realizados.

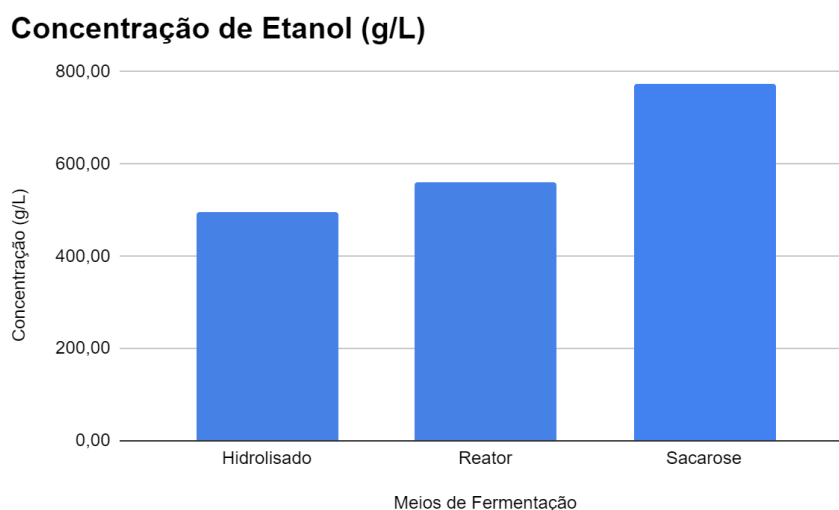
Foi adicionado carvão ativado em todas as amostras de etanol obtidas a fim de remover as impurezas adsorvidas, especificamente os compostos fenólicos presentes nas amostras de etanol. O carvão ativado foi selecionado devido à sua elevada capacidade de adsorção, atribuída à sua complexa estrutura de poros,

elevada área superficial e presença de diversos grupos funcionais na superfície, que facilitam a adsorção de contaminantes orgânicos (Barbosa et al., 2014).

A destilação foi realizada com sucesso, uma vez que o etanol obtido apresentou uma graduação alcoólica próxima ao esperado, atendendo aos padrões de qualidade exigidos. Estudos e normas indicam que a concentração ideal de etanol para eficácia antimicrobiana situa-se entre 60-80%, com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomendando especificamente uma concentração de 70% INPM, equivalente a aproximadamente 77 graus GL. De acordo com a Resolução RDC nº 46 de 20 de fevereiro de 2002 da ANVISA, os antissépticos e desinfetantes alcoólicos devem possuir uma concentração que assegure a eficácia antimicrobiana, tipicamente alcançada em 70% INPM.

Através da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e utilizando a curva de calibração fornecida pelo departamento, foi possível determinar a concentração de etanol nas amostras já destiladas provenientes do meio de sacarose, do hidrolisado e do biorreator, expressa em g/L. Os resultados obtidos, após a aplicação dos parâmetros de calibração e a interpretação dos picos cromatográficos correspondentes ao etanol, estão compilados no Gráfico 10.

Gráfico 10 - Concentração de etanol após a destilação nos diferentes meios de fermentação.



Fonte: Autores, 2024.

As concentrações de etanol obtidas foram de 496,51 g/L para o hidrolisado, 561,28 g/L para o meio de fermentação mimético do biorreator e 773,89 g/L para o meio de sacarose. Esses resultados corroboram os testes de fermentação

anteriores, que indicaram o meio de sacarose como o mais eficiente na produção de etanol.

Por fim, foi produzido álcool em gel (Figura 15) com o etanol resultante da destilação, totalizando 50 mL de produto. Ao final do processo, foram medidos o pH e a viscosidade do produto, com o objetivo de atingir uma viscosidade superior a 8.000 cP (centipoise). A viscosidade medida foi de aproximadamente 10.000 cP, o que está dentro da faixa aceitável para formulações de álcool em gel com concentração superior a 68%. Além disso, o pH do produto foi determinado em 6,5, também dentro da faixa de aceitação da ANVISA, garantindo a conformidade e a eficácia do produto final.

Figura 14 - Álcool em gel produzido com o etanol proveniente da destilação.



Fonte: Autores, 2024.

5.5. Tratamento de resíduos gerados

Para obter os dados, foram realizados os ensaios supracitados, obtendo resultados do teor de sólidos, proteínas e demanda química de oxigênio. A análise de Kjeldahl apresentou resultado indefinido que é abordado adiante. A partir desses, é possível traçar planos de ação para descarte ou reaproveitamento desses resíduos.

5.5.1. Resíduos líquidos

As amostras de resíduo da destilação correspondem ao meio de fermentação com hidrolisado sem as células, que já haviam sido centrifugadas, e sem o etanol, que havia sido destilado. E as amostras de resíduo de pré-tratamento ácido correspondem ao filtrado após o pré-tratamento ácido sendo a solução de ácido acético, peróxido de hidrogênio, ácido sulfúrico, água destilada de lavagem do sabugo pré-tratado e materiais liberados pelo sabugo, como lignina e hemicelulose. A seguir estão dispostos na Tabela 13, os dados obtidos através dos ensaios realizados.

Tabela 13 - Resultados das análises realizadas em relação a sólidos, demanda química de oxigênio e concentração de proteínas.

Resíduos	Sólidos Totais (mg/L)	Sólidos Voláteis (mg/L)	Sólidos Fixos (mg/L)	DQO (g/L)	[Proteínas] (g/L)
Destilação	49803,5 ± 1612,9	38825,0 ± 1518,9	10978,5 ± 94,0	70,6 ± 3,6	2,2 ± 0,4
Pré-tratamento ácido	12733,7 ± 320,7	10577,0 ± 294,9	2156,7 ± 25,8	103,9 ± 3,1	14,0 ± 1,9

Fonte: Autores, 2024.

A partir dos dados obtidos em relação aos sólidos totais, que corresponde a soma dos sólidos voláteis e fixos, nota-se uma quantidade grande de sólidos, elencando que para o descarte dessas substâncias em corpos receptores é necessário tratamento anterior, composto por técnicas de biodigestão elencando biorreatores anaeróbios, biorreatores aeróbicos e lagoa aerada como possibilidades para diminuição de sólidos totais e demanda química de oxigênio.

De acordo com as Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) N° 430/2011, sendo que essa complementa e altera a Resolução N° 357/2005, para o lançamento de efluentes em corpos receptores é necessário que a Demanda Bioquímica de Oxigênio apresente remoção de ao menos 60% e o pH esteja entre 5 e 9. O pH dos resíduos na tabela supracitada foi medido, sendo que os resíduos de destilação e de pré-tratamento ácido apresentaram pH igual a $5,37 \pm 0,06$ e $1,45 \pm 0,09$ respectivamente. Dessa forma, nota-se que mesmo que o resíduo de destilação apresenta o pH esperado, porém é necessário realizar o tratamento para diminuição de demanda de oxigênio, visto que a legislação solicita uma diminuição de ao menos 60%.

Em relação ao resíduo do pré-tratamento ácido, nota-se uma maior dificuldade visando o descarte em corpos de água, devido ao baixo pH e alta DQO. O trabalho de Liao *et al.* (2023) emprega o pré-tratamento com ácido acético como já pontuado na seção 4.5.2 e no trabalho não é abordada uma forma de recuperação dos solventes empregados e nem da lignina removida da madeira utilizada. Dessa forma, é abordado na Seção 5.5.2. um processo alternativo ao descarte convencional, visando empregar o conceito de economia circular.

Em relação ao resíduo da destilação, devido aos custos de tratamento para descarte, mesmo que o pH esteja adequado, tornam a operação mais cara para realizar o descarte. Dessa forma, considerando a legislação brasileira em relação à fertirrigação do solo, tem-se a proposta de utilizar essa vinhaça como componente da irrigação do solo, sendo melhor detalhada na Seção 5.5.3.

5.5.2. Resíduos sólidos

Os resíduos sólidos analisados eram referentes a biomassa que foi centrifugada e separada do meio de cultivo e ao sabugo de milho restante após o pré-tratamento, hidrólise enzimática e centrifugação. Pontuando que a *S. cerevisiae* PE-2 seria reutilizada, pelo sistema de Melle-Boinot, em outros cultivos até a observação de inviabilidade metabólica, através dos métodos que já utilizados para o cálculo da viabilidade celular. Nesse caso as leveduras inviáveis seriam destinadas a outro tratamento, como ração animal ou a confecção de extrato de levedura (Lima *et al.*, 2021).

O método de Kjeldahl foi utilizado seguindo as instruções obtidas na literatura, entretanto não se obteve resultado detectável em relação ao teor de proteínas dos dois resíduos empregados em duplicata. As amostras se mantiveram iguais ao branco após a titulação, mesmo repetindo a digestão e o branco para evitar possíveis erros de operação. A ideia inicial é que o teor de proteínas em ambas as amostras estava abaixo do limite de detecção, visto que o método emprega 100 mg da amostra e o resultado é apresentado em mg de nitrogênio por litro.

Porém, devido à falta de tempo, não foi possível confeccionar as soluções a partir do zero, como os corantes, ácidos e bases, para repetir o experimento e eliminar todas as incertezas e erros possíveis de operação. De acordo com *Association of Official Agricultural Chemists* (2023) para proteínas em ração animal, tem-se a determinação de 0,5 a 50% de nitrogênio do peso seco da amostra por

Kjeldahl, essa colocação reforça a necessidade de repetição de todas as etapas do método, visto que a célula da *Saccharomyces cerevisiae* apresenta de 40 a 58% de proteínas em sua composição, reafirmando a sua capacidade de enriquecer a ração animal, pontuando a aplicação da célula íntegra para gado elencando melhora de funcionamento da flora do animal e melhora de parâmetros sanguíneos como níveis de proteínas, triacilgliceróis e colesterol (Lapeña *et al.*, 2020; Ogbuewu *et al.*, 2019); Lima *et al.*, 2021).

Em relação ao sabugo de milho restante após a hidrólise, para iniciar essa análise é relevante pontuar que é possível otimizar esse processo, diminuindo a quantidade de sólidos. De acordo com a literatura e informações já supracitadas, o sabugo de milho é rico em hemicelulose, celulose, lignina, proteínas, açúcares simples, lipídios, amido, água, hidrocarbonetos, diminuindo as quantidades de acordo com a ordem que foi colocado. Após todas essas etapas, é esperado que se mantenham principalmente as fibras e resquícios que não foram hidrolisados, além das pequenas quantidades que se mantêm em relação aos materiais inorgânicos, chamadas cinzas (Viroli *et al.*, 2022). A melhor solução após a otimização do processo é direcionar o restante desse material a incorporação no solo, visto que devido ao volume obtido vê-se como forma de auxiliar o volume das leiras de compostagem, inclusive devido ao volume maior de material seco em relação à matéria orgânica úmida, cabendo ainda análises massa específica, densidade, cinzas e umidade para verificação deste material, elencando também a adsorção do sabugo de milho, podendo ainda verificar a utilização deste como agente no tratamento de efluentes, visto que já demonstrou eficiência na remoção de compostos orgânicos e inorgânicos a partir da biossorção (Souza *et al.*, 2019).

5.5.3. Perspectivas e destinos dos resíduos

Considerando os resultados apontados, antes de realizar qualquer descarte ou lançamento dos efluentes, foram idealizadas ações para a reutilização dos resíduos gerados, visando aplicar o conceito de economia circular e aumentar a capacidade de realização do projeto em questão. Pontuando ainda que as perspectivas em relação aos resíduos sólidos já foram apontadas na Seção 5.5.2. acima.

Inicialmente, abordando resíduo de ácido acético, visto que apresenta o pH baixo, alto teor de sólidos e alta demanda química de oxigênio. Em observação do

trabalho de Qiao *et al.* (2022), em que os mesmos fazem o reuso do resíduo de pré-tratamento após a rotaevaporação em condições brandas, 60°C, para não danificar a estrutura do ácido orgânico. Idealiza-se que o mesmo pode ser realizado para o resíduo de pré-tratamento ácido do presente trabalho, levando a reutilização desse resíduo e gerando outros subprodutos que são lignina e hemicelulose que não são evaporados (Minu, Jiby e Kishore, 2012; Qiao *et al.*, 2022).

A lignina é considerada um produto de alto valor agregado, elencando que essa é uma substituta desejável para gasolina, além de antioxidantes, materiais retardadores de fogo e precursores de materiais de carbono (Xiong *et al.*, 2023). Assim é possível realizar esse processo através de diferentes formas, sendo necessário após a rotaevaporação do ácido a retirada da fração hemicelulósica, que também pode ser utilizada para a produção de xilooligossacarídeos ou furfural por exemplo, ambos produtos de valor comercial e química fina. Para a retirada desse xarope rico em lignina e xilana pode-se empregar etanol 95% somado de outras etapas (Xiong *et al.*, 2023) ou adição de água destilada no balão com resíduo após a rotaevaporação e centrifugação severa (Qiao *et al.*, 2022).

Em relação a vinhaça, pode-se pontuar que pode-se obter benefícios ao utilizar este devido ao teor nutricional, elencando como uma fonte de nitrogênio para auxiliar no crescimento de plantas além de oferecer um destino para resíduos gerados (Pinaffi *et al.*, 2012). A vinhaça pode ser considerada um subproduto da produção de etanol por hidrolisado de sabugo de milho, entretanto, sua aplicação exige cuidados devido à grande variação na composição e, com isso, deve-se elencar riscos em relação a toxicidade e infiltração do solo gerando contaminação de lençóis freáticos. Pontuando a importância da Resolução nº 357 de 2005 do CONAMA que classifica as águas que podem ser destinadas à irrigação de culturas cerealíferas, no qual se encaixa o milho e conseqüentemente o sabugo, como classe 3, que apresenta os diversos parâmetros de compostos inorgânicos, turbidez, pH e outros que devem ser seguidos para utilização (Brasil, 2011; Brasil, 2005; Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2019)

No estado de São Paulo, é imprescindível citar a Norma Técnica CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - P4.231/2005, que regula todas as atividades e define critérios em relação à vinhaça, no caso de cana-de-açúcar, expandindo o conceito para milho e sabugo de milho devido a falta de legislação específica. A CETESB solicita que a vinhaça esteja em conformidade com a

legislação para pH, sulfato, nitrogênio em diferentes formas, potássio, cálcio, cloreto, sódio e fósforo, além de caracterização do solo a ser aplicada e determinação da dose de aplicação relacionada a óxido de potássio (CETESB, 2015).

6. CONCLUSÃO

A produção de etanol de segunda geração pode apresentar uma pegada de carbono menor em comparação à produção de etanol de primeira geração, que utiliza culturas alimentares. A sustentabilidade desse processo se destaca por reduzir a dependência de matérias-primas alimentares e promover a utilização de resíduos, ajudando a diminuir a quantidade de resíduos sólidos e empregando o conceito de economia circular aproveitando resíduos durante todo o processo. Do ponto de vista econômico, a produção de etanol de segunda geração pode ser mais vantajosa, especialmente em regiões com alta produção de milho, ao aproveitar um subproduto gerando maior valor agregado e geração de novos produtos.

A partir dos resultados obtidos com o pré-tratamento ácido, é possível concluir que este foi eficiente, haja visto o valor de rendimento mássico (75,73%) estar próximo e até mesmo maior do que os encontrados na literatura. Entretanto, uma análise da composição química do sabugo utilizado no trabalho, anterior e posteriormente ao pré-tratamento teriam corroborado para uma maior e melhor interpretação dos resultados, principalmente em relação a baixa eficiência da hidrólise (11,33%), já que assim, seria possível saber o teor de celulose do sabugo e uma resposta mais conclusiva sobre a conversão desta em glicose. Ademais, uma granulometria menor do sabugo para ambas as etapas de pré-tratamento e hidrólise poderia ter ajudado a encontrar melhores resultados.

Os ensaios de fermentação do presente estudo demonstraram uma eficiência de conversão de açúcares em etanol excelente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* da cepa PE-2, a cepa industrial exibiu uma capacidade de consumir parcialmente a xilose, assim como uma resistência elevada, com viabilidade maior que 80%, o magnésio apresentou um efeito protetor aumentando a capacidade de crescimento celular ao dobrar a quantidade de sulfato de magnésio presente nos meios, os resultados também mostram que o período necessário da fermentação foi em média de 4 horas, perdendo álcool depois de um período de 7 horas quando realizado em frascos tipos Erlenmeyer, devido a falta de vedação do sistema.

A destilação do álcool foi bem-sucedida, resultando em um produto com 82° GL, ligeiramente acima do esperado, mas ajustável para 77° GL pela adição de água destilada. Na sequência, a produção de álcool em gel foi realizada conforme as normas estabelecidas pela ANVISA, alcançando uma viscosidade superior a 8000 cp e um pH de 6,5, ambos dentro dos parâmetros de aceitação. Esses resultados indicam a conformidade do produto final com as especificações técnicas e regulatórias, assegurando sua eficácia e segurança para uso sanitário.

Em suma, foi possível realizar a manutenção da levedura e sua expansão para compor o inóculo da fermentação em biorreator e frasco tipo Erlenmeyer, a fase de pré-tratamento apresentou um rendimento adequado, todavia a hidrólise enzimática não se mostrou eficiente, comprometendo a produção de grandes volumes de etanol durante o estudo, além disso, foi observado uma concentração ótima para o crescimento celular e preservação da viabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHAEI, S. *et al.* A comprehensive review on bioethanol production from corn stover: Worldwide potential, environmental importance, and perspectives. **Biomass & bioenergy**, v. 161, n. 106447, p. 106447, 2022.
- ANTUNES, C. P. D. *et al.* **Produção de bioetanol de segunda geração a partir do hidrolisado do albedo da laranja como fonte de biomassa lignocelulósica.** In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA. Florianópolis, 20214. ANVISA. (2002). Resolução RDC nº 46, de 20 de fevereiro de 2002. Dispõe sobre os produtos saneantes com ação antimicrobiana.
- AOAC official method 955.04 - Nitrogen (total) in fertilizers: Kjeldahl method. In: **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.** New York: Oxford University Press, 2023.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.
- BARBOSA, C. S.; SANTANA, S. A. A.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. dos S. Removal of phenolic compounds from aqueous solutions using activated carbon prepared from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): kinetic and thermodynamic equilibrium studies. **Química Nova**, v. 37, n. 3, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140066>.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. Yeasts: Characteristics and identification. **Cambridge: Cambridge University Press**, 2011.
- BASTOS, G. R. **Tecnologia das Fermentações:** Fundamentos de Bioprocessos- Coleção UAB. São Carlos. EdufScar, 2010. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5652827/mod_resource/content/1/TS_Reinaldo_TecnologiaFermentacoes.pdf. Acesso em: 05 mar. 2024.
- BAUER, T. M.; DICKS, L. M. T. Enzymes and fermentation of alcohol. In: HUI, Y. H.; MEUNIER-GODDIK, L.; HANSEN, Á. S.; JOSEPHSON, R. V.; NIP, W.-K.; STOTZEK, C. (eds.). **Handbook of food and beverage fermentation technology.** Boca Raton: CRC Press, p. 497-524. 2003.
- BERBER-VILLAMAR, N. K.; NETZAHUATL-MUÑOZ, A. R.; MORALES-BARRERA, L.; CHÁVEZ-CAMARILLO, G. M.; FLORES-ORTIZ, C. M.; CRISTIANI-URBINA, E. Corn cob as an effective, eco-friendly, and economic biosorbent for removing the azo dye Direct Yellow 27 from aqueous solutions. **PloS One**, v. 13, n. 4, e0196428, 2018.
- BERNARDES, X. H. V. **Etanol a partir do milho:** processo produtivo e questões ambientais. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/39691/1/EtanolPartirMilho.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2024.

BINI, R. L.; PEDRO, A. A.M.; DE MARCHI, A. Comparação de Dois Tipos de Impelidores para Dimensionamento de Um Tanque de Agitação de Bancada para Produção de Álcool em Gel. **Revista Científica Unilago**, v. 1, n. 1, 2021. Disponível em: <https://revistas.unilago.edu.br/index.php/revista-cientifica/article/view/625>. Acesso em: 05 mar. 2024.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Distribuição; Preços do Etanol Hidratado ao Consumidor**, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/arquivos-anuario-estatistico-2022/secao-4/texto/secao4.pdf>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - **RDC nº 46**, de 20 de fevereiro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília DF, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - **RDC nº 490**, de 8 de abril de 2021. Diário Oficial da União, Brasília DF, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - **RDC nº 67**, de 8 de outubro de 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias. Diário Oficial da União, Brasília DF, 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Resolução nº 357** de 18/03/2005 (Federal) - Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Resolução Nº 430** de 16/05/2011 (Federal) - Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. 2011.

BUSTAMANTE, C. C. M. **Transferência de Oxigênio e Condições de Cisalhamento em Biorreator Convencional com Impelidores Orelha de Elefante**. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/3953/6133.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 05 mar. 2024.

CAETANO, E. de O.; FERREIRA, D. F.; SILVA, T. M. *et al.* Qualidade e eficácia in vitro de géis alcoólicos para uso no sistema público de saúde em municípios da região sul do Espírito Santo, Brasil. **Brazilian Journal of Health Research**, v. 23, n. 4, p. 28–37, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.47456/rbps.v23i4.36579>.

CAGLIARI, R. **Prospecção e análise *in silico* de enzimas celulases de espécies de fungos fitopatogênicos com potencial aplicação na produção de biocombustíveis**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) - Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

CAMARGO, Anna Laura Bueno de. **Obtenção de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes a inibidores de substrato lignocelulósico**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CAMPOREZI, Júlio Dias; MODOLO, Mariana Uliana; PINHEIRO, Flávia de Abreu. Metodologia científica: determinação do rendimento de produção de etanol de grãos de milho por via seca em escala laboratorial. Sete Lagoas: **Embrapa**, 2020.

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

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Vinhaça: critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**. São Paulo, Norma Técnica P 4.231, 2005, 15p.

CHANG, V. S.; NAGWANI, M.r; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 74, p. 135-159, 1998.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E. Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties. **Journal of Food Science**, 69(1), 2004. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb17858.x.

CHEN, A.; QU, T.; SMITH, J. R.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Osmotic tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: Implications for food and bioethanol industries. **Food Bioscience**, v. 60, p. 104451, 2024.

CHERUBIN, Rudimar Antônio. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CORREA, C et al. Brazil and the world market in the development of technologies for the production of second-generation ethanol. **Alexandria Engineering Journal**, v. 67, p. 153-170, 2023.

COSTA, B. E. B. *et al.* Comparação entre a Hidrólise Química e Enzimática da Biomassa Lignocelulósica para a Produção de Bioetanol: uma Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 1-18, 2021.

COSTA, L. F. M. *et al.* Degradação lignocelulósica por hidrólise enzimática visando a produção de Etanol. **Revista Técnico-Científica do IFSC**, v. 2, n. 7, p. 52-61, 2018.

COVRE, E. A. **Efeito do 4-etilfenol sobre o crescimento e capacidade fermentativa da linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2**. 2019.

CRUZ, H. R. **Avaliação da relação C/N no desempenho da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CUNHA, J. T. et al. Contribution of PRS3, RPB4 and ZWF1 to the resistance of industrial *Saccharomyces cerevisiae* CCUG53310 and PE-2 strains to lignocellulosic hydrolysate-derived inhibitors. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 7-16, 2015.

D'ALESSANDRO, N. C. de O.; REZENDE, R. M.; MANSO, J. A. X. et al. Chemical, ecotoxicological, cytotoxic, and mutagenic evaluation of gelling agents used in the production of 70% alcohol gel. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 105, n. 104322, p. 104322, 2024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2023.104322>.

COSTA SANTOS, V. **Estudo sobre a viabilidade técnica para o tratamento do bagaço de malte a partir da hidrólise**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) - Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

SILVA, D. M. **Produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a partir da hidrólise de sabugo de milho (*Zea mays* L.)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2018.

SILVA, G. M. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

SILVA, M. D. et al. Utilização de Hidrolisado de Sabugo de Milho para Produção de Etanol de Segunda Geração por Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602. **Editora Científica Digital eBooks**, p. 252–271, 1 jan. 2022. Disponível em: <https://www.editoracientifica.com.br/articles/code/221211268>. Acesso em: 3 mar. 2024.

SILVA, V. F. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

DAI, Y. et al. High conversion of xylose to furfural over corncob residue-based solid acid catalyst in water-methyl isobutyl ketone. **Industrial crops and products**, v. 180, n. 114781, p. 114781, 2022.

DE CARLI, C. M. **Hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada para produção de etanol 2G**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009.

OLIVEIRA, L, B, S. **Pré-tratamento organossolve da biomassa residual de eucalipto utilizando etanol**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis)- Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021.

PAULA MORAES, V. **Uma revisão da literatura sobre diferentes tecnologias empregadas para o pré-tratamento da biomassa vegetal visando à produção de etanol de segunda geração**. Monografia (Obtenção do Título de Engenheiro Químico) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

DIAS, C. *et al.* Atividade Microbiana e desenvolvimento de plantas em solo tratado com vinhaça. **Colloquium Exactarum**, v. 4, 2012. Disponível em: <https://www.unoeste.br/site/enepe/2012/suplementos/area/>. Acesso em: 05 mar. 2024.

ESPÍRITO SANTO, M.C. **Otimização de estratégias de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

PRADO MARINHO, C. C. *et al.* Pré-tratamento ácido da palha de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração. **Revista Tecnologia e Sociedade**, v. 16, n. 41, p. 1-14, 2020.

SANTOS, M. S. R. **Estudo de pré-tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G**. 74 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014. Disponível em: <https://www.repositorio.ufal.br/jspui/bitstream/riufal/1204/pdf>.

DUSSAN, K. *et al.* The effect of hydrogen peroxide concentration and solid loading on the fractionation of biomass in formic acid. **Carbohydrate polymers**, v. 111, p. 374–384, 2014.

DUVAL, Eduarda Hallal *et al.* **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas industriais geneticamente modificadas de *Saccharomyces cerevisiae***. 2012.

EARDLEY, J.; TIMSON, D. J. Yeast cellular stress: Impacts on bioethanol production. **Fermentation**, v. 6, n. 4, p. 109, 2020.

EMBRAPA. Fermentação. **Embrapa**. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos/processos/tipos-de-processos/fermentacao>. Acesso em: 20 jun. 2024.

EMBRAPA. IMPORTÂNCIA socioeconômica. **Embrapa**. [S.l.: s.n.], [202-]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/milho/pre-producao/socioeconomia/importancia-socioeconomica>.

FARIA, Francys Pimenta de. **Alumínio: ação tóxica sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e o efeito protetor do ácido cítrico e magnésico.** 2010.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Química Nova**, 4 ago. 2017.

FLORENCIO, I. M. et al. Produção de etanol a partir de lactossoro industrial. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 1088-1092, 2013.

FURLANI, J. M. S. **Influência de compostos fenólicos na fermentação de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* de panificação e identificação de seus produtos de bioconversão.** 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GANDAM, P. K. et al. Second-generation bioethanol production from corncob – A comprehensive review on pretreatment and bioconversion strategies, including techno-economic and lifecycle perspective. **Industrial crops and products**, v. 186, n. 115245, p. 115245, 2022.

GISCH, C. et al. Caracterização e Eficácia de Álcool Gel. **Cosmetics and Toiletries (Brasil)**, vol. 29, nov-dez, 2017. Disponível em: https://www.cosmeticsonline.com.br/ct/painel/class/artigos/uploads/ecf62-CT296_48-54.pdf. Acesso em: 18 jun. 2024.

GLOBO RURAL. **Produção de milho no Brasil deve atingir 129 milhões de toneladas em 2023/24.** São Paulo, 2023. Disponível em: <https://globorural.globo.com/agricultura/milho/noticia/2023/12/producao-de-milho-no-brasil-deve-atingir-129-milhoes-de-toneladas-em-202324-diz-consultoria.ghtml>.

GODINHO, E. Z., et al. Pré-tratamento hidrotérmico alcalino e alcalino oxidativo sobre os teores de celulose e lignina em biomassa de capim elefante BRS Capiapu. **Journal of Bioenergy and Food Science**, 6(3): 51-65. 2019. doi: 10.18067/jbfs.v6i2.263

GONÇALVES, C. M. et al. Produção e análise química de cachaça de alambique a partir de cepa selecionada de *Saccharomyces cerevisiae*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 37, n. 2, 2021.

ISIDORIO, S. A. M. **Etapas de pré-tratamento de bagaço de cana de açúcar para a produção de etanol de segunda geração: uma revisão.** Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Processos Químicos) - Faculdade de Tecnologia de Campinas. Campinas, 2022.

JING, J. L. J., et al. Hand sanitizers: A review on formulation aspects, adverse effects, and regulations. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 9, p. 3326, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph17093326>.

JUNIOR, M. A.; ARÉVALO, S. D. Z. Estudo da Termólise de Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* de usina de álcool usando energia de microondas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 1, 2001.

KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus*. In: KREIG, N. R.; HOLT, J. G. (eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer,. v. 2, p. 1209-1234. 1986.

LAMOUNIER, K. F. R. et al. **Produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Galactomyces geotrichum* e *Saccharomyces cerevisiae***. 2018.

LAPEÑA, D. *et al.* Production and characterization of yeasts grown on media composed of spruce-derived sugars and protein hydrolysates from chicken by-products. **Microbial cell factories**, v. 19, n. 1, 2020.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WONG, H. Y. **Rapid determination of yeast viability**. Biotechnology Bioengineering Symposium, [s. l.], n. 11, 1981.

LIMA, A. U. *et al.* **Biotecnologia industrial- Vol. 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 2 ed. São Paulo. Editora Blucher, 2021.

LOPES, Milena Moreira. **Avaliação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho suplementado com proteína de farelo de soja solubilizada para obtenção de bioetanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

MADIGAN, M. T., MARTINHO, J., DUNLAP, P. V., CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MADIGAN, M. T.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; SATTLEY, W. M.; STAHL, D. A. **Brock biology of microorganisms**. 15. ed. Boston: Pearson, 2018.

MARQUES, A. T. **O uso de fermento reciclado com teor reduzido em metabólitos e seu efeito na fermentação alcoólica**. 1997. Tese (Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/115826>. Acesso em: 04 mar. 2024.

MELHORIM, L. **Impactos da Utilização do Milho como Matéria-Prima no Preço Final do Etanol Brasileiro**. 2021. Projeto Final de Curso (Bacharel em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021. Disponível em: <https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/14072/1/03LOMelhorim.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2024.

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

MINU, K.; JIBY, K. K.; KISHORE, V. V. N. Isolation and purification of lignin and silica from the black liquor generated during the production of bioethanol from rice straw. **Biomass & bioenergy**, v. 39, p. 210–217, 2012.

MONACO, M. A. S. L. **Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MONSALVE, J. F.; MEDINA DE PEREZ, V. I.; RUIZ COLORADO, A. A. Producción de Etanol a partir de la Cáscara de Banano y de Almidón de Yuca. **Grupo de Bioprocessos-Grupo de Combustibles Alternativos**, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín. 2006.

MONTIEL, G. D. **Avaliação da Suplementação de Mosto com Nutrientes Inorgânicos em Processo de Produção de Bioetanol**. 2022. Dissertação (Mestrado Profissional em Biomateriais, Bioprocessos e Bioprodutos) - Faculdade de Ciências farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2022. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/3ce9a886-b59f-412f-9374-38ddf3597ace/content>. Acesso em: 03 mar. 2024.

MORAES, O. I. *et al.* **Biotecnologia industrial** - Vol. 4: Biotecnologia na Produção de Alimentos. 2 ed. São Paulo. Editora Blucher, 2021.

MÜLLER, C. M. *et al.* Resíduos de Cana-de-Açúcar e Milho como Matéria-Prima do Etanol 2G: atualidades e perspectivas. In: **Impactos das Tecnologias na Engenharia Química 3**. São Paulo : Atena , 2019. p. 1-18. Disponível em: <https://atenaeditora.com.br/catalogo/ebook/impactos-das-tecnologias-na-engenharia-quimica>. Acesso em: 03 mar. 2024.

MUSSATTO, S. 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.

NAKAEMA, H. **Estratégias de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica para melhorar a produção de biogás e bioquímicos em biorrefinarias**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química)- Departamento de Engenharia Química, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2021.

NOGUEIRA, C. DA C. *et al.* In-situ detoxification strategies to boost bioalcohol production from lignocellulosic biomass. **Renewable energy**, v. 180, p. 914–936, 2021.

NOSCHANG, J.; SCHMIDT, A. P.; BRAUNER, C. C. *Saccharomyces cerevisiae* in ruminant nutrition: Review. **PubVet**, v. 13, n. 02, 2019.

OGBUEWU, I. P. *et al.* Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and its effect on production indices of livestock and poultry—a review. **Comparative clinical pathology**, v. 28, n. 3, p. 669–677, 2019.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549–1558, 2010.

PACHECO, Thályta Fraga. **Tecnologia industrial**. 2012.

PANDIYAN, K. et al. Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 132, p. 723-741, 2019.

PAVLAK, Marta Cristina de Menezes et al. Estudo da fermentação do hidrolisado de batata-doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. **Química nova**, v. 34, p. 82-86, 2011.

PELCZAR, J. R.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1997, 1324p.

PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 130–136, 2011.

PETRIN, Thais Helena Costa. **Engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*: assimilação de xilose e evolução adaptativa em linhagens industriais visando a produção de etanol**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PICÃO, W. B. **Estudo da Velocidade de Agitação na Produção de Riboflavina por *Bacillus subtilis* em Biorreator Mecanicamente Agitado e Aerada**. 2021. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/9c9e1143-5b00-4864-8680-836edf5498f8/content>. Acesso em: 05 mar. 2024.

PINHEIRO, L. U. **Análise de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica para produção de biogás utilizando hidrólise ácida e básica**. Monografia (Bacharel em Química Industrial)- Instituto Federal do Espírito Santo, Vila Velha, 2022.

QIAO, H. et al. An integrated lignocellulose biorefinery process: Two-step sequential treatment with formic acid for efficiently producing ethanol and furfural from corn cobs. **Renewable energy**, v. 191, p. 775–784, 2022.

RAAB, Andreas M. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. **Metabolic engineering**, v. 12, n. 6, p. 518-525, 2010.

REIS, V. R. **Efeito do substrato e das condições de tratamento do fermento sobre a fermentação etanólica contaminada com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e *Lactobacillus fermentum***. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RENDULIĆ, Toni et al. Mitochondrial membrane transporters as attractive targets for the fermentative production of succinic acid from glycerol in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 24, p. foae009, 2024.

RIBEIRO, L. M. L. **Etanol de milho**: Processo produtivo e contexto atual do mesmo no Brasil. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/37913/1/EtanoldeMilhoProcesso.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2024.

RODRIGUES, C. C. **Análise do comportamento proliferativo de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* por citometria de fluxo**. 2017.

SAHANA, G. R.; BALASUBRAMANIAN, B.; JOSEPH, K. S.; PAPPUSWAMY, M.; LIU, W.-C.; MEYYAZHAGAN, A.; KAMYAB, H.; CHELLIAPAN, S.; JOSEPH, B. V. A review on ethanol tolerance mechanisms in yeast: Current knowledge in biotechnological applications and future directions. **Process Biochemistry** (Barking, London, England), v. 138, p. 1–13, 2024.

SANTIAGO, B. L. S.; RODRIGUES, F. D. Á. Processamento de Biomassa Lignocelulósica para produção de etanol: uma revisão. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 7, p. 1011–1022, 6 set. 2017.

SANTOS FILHO, C. B. D. J. **Valorização de sabugo de milho**: potencial para produção de etanol de segunda geração e uso de lignina residual da hidrólise enzimática como adsorvente de corante catiônico. 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021. Disponível em: https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/44794/1/Valorizacaosabugomilho_CostaFilho_2021.pdf.

SANTOS-ROCHA, M. S. R., *et al.* **Pré-tratamento hidrotérmico de resíduos do milho visando à produção de etanol de segunda geração**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2017.

SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia industrial- vol. 2**: Engenharia Bioquímica. 2 ed. São Paulo. Editora Blucher, 2021.

SEQUINEL, R.; LENZ, G.; SILVA, F. *et al.* Solução à base de álcool para higienização das mãos e superfícies na prevenção da COVID-19: Compêndio informativo sob o ponto de vista da química envolvida. **Química nova**, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170553>.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM RURAL. **Irrigação: fertirrigação e reúso. / Serviço Nacional de Aprendizagem Rural**. – Brasília: Senar, 2019. 64 p. ISBN: 978-85-7664-218-3

SILVA, T. P. **Avaliação de antisséptico em bioprocesso de produção de etanol**. 2020. 59p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2020.

SILVA, V. J. M. *et al.* Importância do álcool em gel 70°INMP e propriedades comparativas ao álcool líquido 46,2°INPM. In: **Educação, Trabalho e Saúde: caminhos e possibilidades em tempos de pandemia**. [s.l.] Editora Científica Digital, 2022. p. 10–19. <https://www.editoracientifica.com.br/articles/code/220308094>

SOLARTE-TORO, J. C. *et al.* Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 587–601, 2019.

SOUZA, E. F. F. S. *et al.* Avaliação da capacidade adsortiva do sabugo de milho triturado/Assessment of the adsorptive capacity of shrimped corncob. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 4, p.1174-1190, 2019. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJAER/article/view/2574/2580>.

SOUZA, E. F. F. S. **Avaliação da capacidade adsortiva do sabugo de milho, utilizando azul de metileno**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Agrícola e Ambiental) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2017.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744–4753, jul. 2010.

TEIXEIRA, G. G. **Determinação de açúcar em amostras alimentícias a partir de imagens digitais**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

TERÁN HILARES, R. *et al.* Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. **Food chemistry**, v. 245, p. 786–791, 2018.

VANZELLA, E. *et al.* Processo fermentativo na indústria sucroalcooleira. **Acta Iguazu**, v. 3, n. 1, p. 50-58, 2014.

VELOSO, I. I. K. **AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EXTRATIVA EM DIFERENTES TEMPERATURAS COM REMOÇÃO DE ETANOL POR ARRASTE COM CO₂**. 2023. 155 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2023.

VIROLI, S. L. M. *et al.* Caracterização da farinha do sabugo de milho e sua utilização como alternativa para enriquecimento de produtos alimentícios. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e26111225783, 2022.

WEINEM, J. D. **Estudo da viabilidade econômica para diferentes pré-tratamentos da biomassa da cana-de-açúcar na produção de etanol de segunda geração**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia

Biotecnológica) - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista. Assis, 2022.

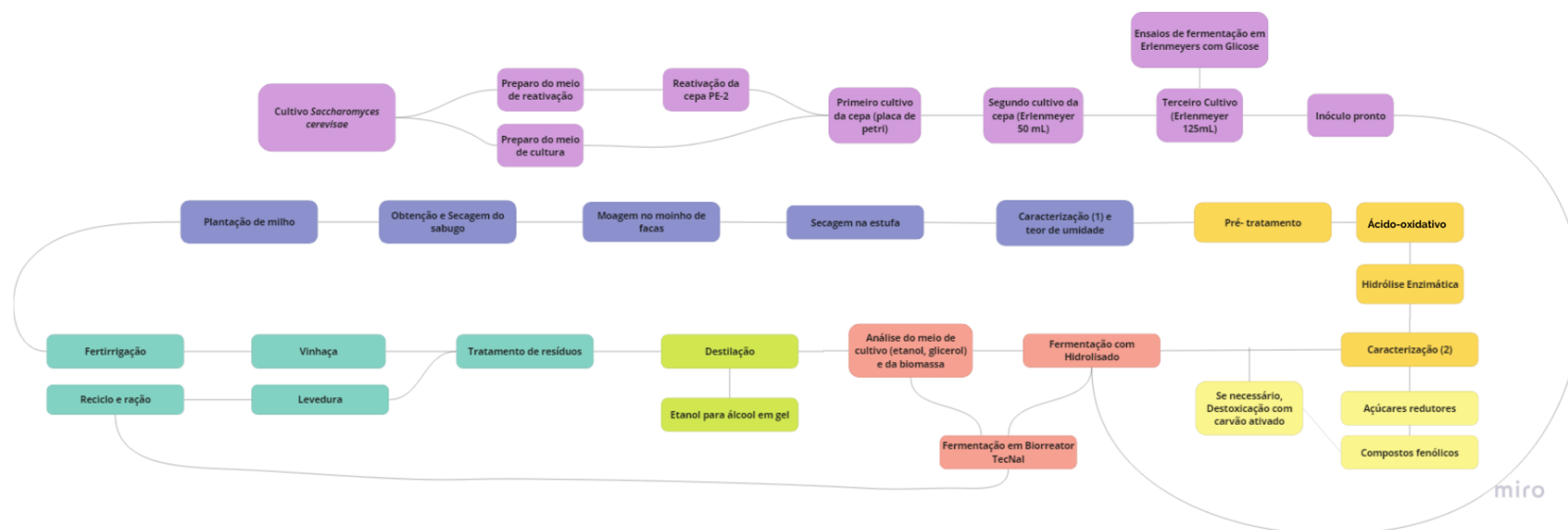
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Water, sanitation, hygiene, and waste management for SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19. COVID-19: Infection prevention and control. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-IPC-WASH-2020.4>. Acesso em: 08 jun. 2024.

XIONG, B. *et al.* Formic acid-facilitated hydrothermal pretreatment of raw biomass for co-producing xylo-oligosaccharides, glucose, and lignin. **Industrial crops and products**, v. 193, n. 116195, p. 116195, 2023.

ZAMORA-ZAMORA, Hernan Dario. **Produção simultânea de hemi(celulases) e açúcares redutores por *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de *Alstroemeria sp.*** 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. DOI: 10.14393/ufu.di.2017.134.

ZU, S. *et al.* Pretreatment of corn stover for sugar production using dilute hydrochloric acid followed by lime. **Bioresource technology**, v. 152, p. 364–370, 2014.

APÊNDICE I



Apêndice I. Fluxograma do processo de produção de etanol de segunda geração a partir do hidrolisado de sabugo de milho.