



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

Marcello Lima Bertuci

**Produção de etanol 2G a partir de hidrolisados de cascas de arroz por co-
cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus*
imobilizadas em alginato de sódio**

**São José do Rio Preto
2021**

Marcello Lima Bertuci

Produção de etanol 2G a partir de hidrolisados de cascas de arroz por co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* imobilizadas em alginato de sódio

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – 132024/2019-5

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

**São José do Rio Preto
2021**

B552p

Bertuci, Marcello Lima

Produção de etanol 2G a partir de hidrolisados de cascas de arroz por cocultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* imobilizadas em alginato de sódio / Marcello Lima Bertuci. -- São José do Rio Preto, 2021

87 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz

1. Brioprocessos. 2. Bioetanol. 3. Biomassa. 4. Celulose. 5. Hemicelulose. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Marcello Lima Bertuci

Produção de etanol 2G a partir de hidrolisados de cascas de arroz por co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* imobilizadas em alginato de sódio

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – 132024/2019-5

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz
UNESP – Câmpus São José do Rio Preto.
Orientador

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – Câmpus São José do Rio Preto.

Prof^a. Dr^a. Juliana Ferreira
AEMS – Três Lagoas.

São José do Rio Preto
29 de abril 2021

Dedico este trabalho para minha família pelo suporte em todos os momentos desta jornada: meus pais Leonardo Bertuci e Marcilene Lima Bertuci e irmão Leonardo Bertuci Junior.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por sempre estar presente em minha vida, pela confiança e compreensão. Mesmo na distância, sempre se fizeram presentes e isso foi fundamental para que mais essa etapa fosse alcançada. Aos meus pais, irmão e tios Marcele e Márcio, só tenho a agradecer a vocês pelo carinho e apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Crispin, que me orientou durante o mestrado com muita paciência. Obrigado pela confiança e pelos ensinamentos que foram dados durante esse ciclo.

Agradeço o apoio financeiro do CNPq - 132024/2019-5, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil.

Agradeço a todos meus amigos que adquiri nessa jornada, Caroline, Francielli, Gustavo, João Marcos, Mariana Garcia, Mariane Daniella, Raísa, Thyago, Victoria e Yara. Vocês foram fundamentais para que minha experiência fosse mais “saudável”, obrigado pelas risadas, por me escutarem sempre desabafar e reclamar. Quero novamente agradecer e dizer que não teria conseguido chegar aqui sem apoio de cada um de vocês.

Agradeço aos membros da banca por participarem com suas contribuições para a melhoria deste trabalho.

RESUMO

A produção de uma forma alternativa de combustível que substitua os combustíveis de origem fóssil vem sendo cada vez mais estudada devido aos impactos ambientais gerados pelo seu uso excessivo, bem como, ao esgotamento dessas fontes fósseis de energia. Portanto, o uso dos resíduos agroindustriais pode se tornar uma fonte renovável de energia, além de diminuir impactos ambientais. O objetivo deste trabalho foi produzir bioetanol de segunda geração como alternativa aos combustíveis fósseis. Para isso, a casca de arroz foi submetida a hidrólise ácida (fonte de carbono) para produção dos açúcares fermentescíveis a serem utilizados pelo consórcio de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus*. Na preparação dos hidrolisados foi utilizado ácido sulfúrico (H_2SO_4), nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0% v/v nos períodos de 5, 10 e 15 minutos de aquecimento a 121°C em autoclave e 12 e 24 horas em temperatura ambiente. Após foi realizada a desintoxicação desses hidrolisados com carvão ativado. A hidrólise ácida de 2% v/v e o tempo de aquecimento de 10 minutos apresentaram as concentrações de açúcares redutores de 33,00 mg/mL para o hidrolisado e 30,36 mg/mL após a desintoxicação. A melhor produção de etanol com *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizando o meio sintético (20,6 mg/mL) e para a levedura *Pachysolen tannophilus* a maior produção foi de 11,67 mg/mL de meio sintético. O consórcio das duas leveduras se mostrou eficiente com uma maior produção de etanol chegando a 21,5 mg/mL no meio sintético. Os meios hidrolisados e desintoxicados mostraram grande potencial para produção de etanol 18,65 mg/mL e 19,34 mg/mL respectivamente em consórcio, tal como a imobilização em alginato de sódio que se mostrou eficiente em melhorar o potencial da fermentação.

Palavras-chave: Hidrólise ácida. Consórcio. Resíduos agroindustriais. Bioetanol.

ABSTRACT

The production of an alternative form of fuel that replaces fossil fuels has been increasingly studied due to the environmental impacts generated by its excessive use, as well as the depletion of these fossil energy sources. Therefore, the use of agro-industrial waste can become a renewable source of energy, in addition to reducing environmental impacts. The objective of this work was to produce second generation bioethanol as an alternative to fossil fuels. For this, the rice husk was subjected to acid hydrolysis (carbon source) to produce fermentable sugars to be used by the yeast consortium *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus*. In the preparation of the hydrolysates, sulfuric acid (H_2SO_4) was used, in concentrations of 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 and 5.0% v/v in the periods of 5, 10 and 15 minutes of heating at 121°C in an autoclave and 12 and 24 hours at room temperature. Afterwards, the detoxification of these hydrolysates with activated carbon was carried out. The acid hydrolysis of 2% v/v and the heating time of 10 minutes showed the concentrations of reducing sugars of 33.00 mg/mL and 30.36 mg/mL after detoxification. The best ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae* was using the synthetic medium (20.6 mg/mL) and for the yeast *Pachysolen tannophilus* the highest production was 11.67 mg/mL. The intercropping of the two yeasts proved to be efficient with a greater production of ethanol reaching 21.5 mg/mL in the synthetic medium. The hydrolyzed and detoxified media showed great potential for ethanol production 18.65 mg/mL and 19.34 mg/mL respectively in consortium, such as immobilization in sodium alginate, which proved to be efficient in improving the fermentation potential.

Keywords: Acid hydrolysis. Consortium. Agroindustrial waste. Bioethanol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura linear da celulose.....	22
Figura 2: Estrutura linear da hemicelulose.....	22
Figura 3. Estrutura molecular da lignina.....	23
Figura 4. Estrutura simplificada da fibra vegetal de materiais lignocelulósicos.....	23
Figura 5. Esquema de hidrólise ácida da celulose.....	24
Figura 6: Degradação da biomassa lignocelulósica.....	26
Figura 7: Compostos tóxicos liberados por diferentes tratamentos.....	26
Figura 8. Composição da biomassa lignocelulósica e os principais derivados da hidrólise.....	27
Figura 9: Mapa da produção agrícola no Brasil em 2019/2020.....	29
Figura 10. Conversão de xilose em xilulose 5-fosfato por <i>P. tannophilus</i> por meio de três reações enzimáticas reversíveis que requerem cofator.....	31
Figura 11. Rota metabólica empregada por <i>P. tannophilus</i> no metabolismo de pentoses. Representa a via das pentoses fosfato e a via Embden-Meyerhoff.....	32
Figura 12. Rota metabólica de fermentação alcoólica em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
Figura 13. Açúcares redutores obtidos durante hidrólise ácida com e sem uso de temperatura (121°C e 1 kgf/cm ²) nos tempos de 5, 10 e 15 minutos; 12 e 24 horas.....	45
Figura 14. Açúcares totais obtidos durante hidrólise ácida com e sem uso de temperatura elevada (121°C e 1 kgf/cm ²) nos tempos de 5, 10 e 15 minutos; 12 e 24 horas.....	46
Figura 15. Quantidade de compostos fenólicos liberados durante o processo hidrólise ácida com e sem uso de temperatura elevada (121°C e 1 kgf/cm ²) nos tempos de 5, 10 e 15 minutos; 12 e 24 horas.....	47

Figura 16. Cinética do pH, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em um período de 24 horas.....	52
Figura 17. Consumo de açúcares presentes, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em um período de 24 horas.....	53
Figura 18. Cinética do crescimento celular (biomassa), determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em um período de 24 horas.....	54
Figura 19. Cinética da produção de etanol, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em um período de 24 horas.....	55
Figura 20. Produtividade do etanol, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em um período de 24 horas.....	57
Figura 21. Cinética do pH, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por <i>Pachysolen tannophilus</i> em um período de 24 horas.....	59
Figura 22. Consumo de açúcares, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por <i>Pachysolen tannophilus</i> em um período de 24 horas.....	60
Figura 23. Cinética do crescimento celular (biomassa), determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por <i>Pachysolen tannophilus</i> em um período de 24 horas.....	62
Figura 24. Cinética da produção de etanol, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por <i>Pachysolen tannophilus</i> em um período de 24 horas.....	63
Figura 25. Produtividade do etanol, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por <i>Pachysolen tannophilus</i> em um período de 24 horas.....	65
Figura 26. Cinética do pH, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD pelo consorcio de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pachysolen tannophilus</i> em um período de 24 horas.....	67

Figura 27. Consumo de açúcares, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD pelo consorcio de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pachysolen tannophilus</i> em um período de 24 horas.....	68
Figura 28. Cinética do crescimento celular (biomassa), determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD pelo consorcio de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pachysolen tannophilus</i> em um período de 24 horas.....	69
Figura 29. Cinética da produção de etanol, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD pelo consorcio de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pachysolen tannophilus</i> em um período de 24 horas.....	70
Figura 30. Produtividade de etanol, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD pelo consorcio de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pachysolen tannophilus</i> em um período de 24 horas.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal de diferentes resíduos lignocelulósicos.....	21
Tabela 2 - Meio de manutenção das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 e <i>Pachysolen tannophilus</i> CCT 1891.....	37
Tabela 3 - Composição do meio sintético.....	39
Tabela 4 - Relação entre as variáveis tempo, temperatura e concentração de ácido. Em relação as análises de açúcares totais, redutores e compostos fenólicos.....	44
Tabela 5 - Análises de açúcares redutores, totais e compostos fenólicos, comparando o hidrolisado antes e após o processo de desintoxicação.....	49
Tabela 6 - Medidas de pH, biomassa, etanol e produtividade da fermentação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio sintético.....	50
Tabela 7 - Medidas de pH, biomassa, etanol e produtividade da fermentação de <i>Pachysolen tannophilus</i> em meio sintético.....	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	19
3.1 Bioetanol.....	19
3.2 Resíduos lignocelulósicos.....	20
3.3 Hidrólise de resíduos lignocelulósicos.....	24
3.3.1 Hipóteses de inibição por compostos tóxicos.....	27
3.3.1.1 Furanos.....	27
3.3.1.2 Compostos fenólicos.....	28
3.3.2 Desintoxicação.....	28
3.4 Casca de arroz.....	29
3.5 Micro-organismos produtores de bioetanol.....	30
3.5.1 <i>Pachysolen tannophilus</i>	30
3.5.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
3.5.3 Consórcio de micro-organismos.....	34
3.5.4 Imobilização celular.....	34
3.6 Alginato de sódio.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Resíduo industrial de arroz.....	36
4.2 Hidrólise ácida das cascas de arroz.....	36
4.2.1 Desintoxicação.....	37
4.3 Micro-organismos.....	37
4.3.1 Meios de manutenção.....	37
4.4 Preparo do pré-inóculo.....	38
4.5 Imobilização celular - aprisionamento das células em gel de alginato.....	38
4.6 Meios de fermentação.....	38
4.6.1 Meio sintético.....	38
4.6.2 Meio contendo os resíduos hidrolisados da casca de arroz.....	39
4.7 Condições de fermentação.	39

4.7.1 Avaliação das variáveis que podem influenciar a produção de etanol pelas leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pachysolen tannophilus</i>	39
4.7.2 Avaliação das fermentações utilizando os hidrolisados.....	40
4.8 Métodos analíticos.....	40
4.8.1 Determinação do pH final.....	40
4.8.2 Determinação de etanol.....	40
4.8.3 Determinação de açúcares totais (AT).....	41
4.8.4 Determinação de açúcares redutores (AR).	41
4.8.5 Determinação do teor de compostos fenólicos.	41
4.9 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Padronização da hidrólise ácida da casca de arroz.....	43
5.2 Desintoxicação do hidrolisado.....	48
5.3 Fermentação.....	50
5.3.1 Fermentação com a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
5.3.1.1 Alteração de pH no meio de fermentação.....	51
5.3.1.2 Consumo de açúcares durante a fermentação.....	52
5.3.1.3 Crescimento Celular (produção de Biomassa) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
5.3.1.4 Produção de bioetanol de segunda geração.....	55
5.3.1.5 Produtividade.....	56
5.3.2 Fermentação com a levedura <i>Pachysolen tannophilus</i>	58
5.3.2.1 Alteração de pH no meio de fermentação.....	59
5.3.2.2 Consumo de açúcares durante a fermentação.....	60
5.3.2.3 Crescimento celular (produção de Biomassa) da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i>	61
5.3.2.4 Produção de bioetanol de segunda geração.....	63
5.3.2.5 Produtividade.....	64
5.3.3 Fermentação pelo consorcio de micro-organismos.....	66
5.3.3.1 Alteração de pH no meio de fermentação.....	66
5.3.3.2 Consumo de açúcares durante a fermentação.....	67
5.3.3.3 Crescimento celular (Biomassa) do consorcio de leveduras.....	69
5.3.3.4 Produção de bioetanol de segunda geração por consorcio de leveduras.....	70

5.3.3.5 Produtividade.....	71
6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE A – Curva de calibração da Concentração de Açúcares Totais.....	83
APÊNDICE B – Curva de calibração da concentração de Açúcares Redutores	84
APÊNDICE C – Curva de calibração da Concentração de Ácido Vanílico	85
APÊNDICE D – Curva de calibração do crescimento celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
APÊNDICE E – Curva de calibração do crescimento celular da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i>	87

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A preocupação para diminuir a emissão de gases ligados ao efeito estufa, principalmente derivada dos automóveis, tem motivado a procura por substituintes aos combustíveis fósseis que causem menor impacto ambiental. Devido a isto, a obtenção de biocombustíveis a partir de fontes alternativas têm-se tornado maior foco de estudo. Assim, são uma alternativa para diminuir o uso de combustíveis derivados do petróleo, cuja oferta e preço dependem dos humores dos países produtores, além de gerar vários danos ambientais.

Os biocombustíveis são combustíveis produzidos a partir de matéria orgânica. A produção de etanol de segunda geração pode ser realizada utilizando resíduos agroindustriais. Vários países consideram o uso desta biomassa uma alternativa com capacidade de elevar o desenvolvimento econômico, além de reduzir a emissão de gases de efeito estufa causados uso de combustíveis fósseis.

A pesquisa de alternativas para aumentar a produção de biocombustíveis tem se tornado um desafio biotecnológico, devido à grande quantidade de recursos disponíveis para sua produção, uma vez que, modelos de gestão eficientes garantem aspectos técnicos, econômicos e ambientais.

Dentre a produção agrícola mundial a do Brasil tem-se destacado pelo vasto território que utiliza e sua produção agrícola cada vez maior. Isto gera grande quantidade de resíduos que podem ter aplicação na produção, em grande escala no cenário nacional, do bioetanol de segunda geração.

A produção do bioetanol de segunda geração usa como matéria prima a biomassa lignocelulósica e pode utilizar processos de origem química (usando ácido e base), física ou biológicos (uso de enzimas). Esses quebram a celulose e hemicelulose presente nesses resíduos liberando os açúcares comumente utilizados pelos micro-organismos para realizar os processos fermentativos para produção de etanol. Contudo, para o consumo destas hexoses e pentoses, não existe um micro-organismo único que consiga utilizar esses dois tipos de açúcares fermentáveis. Portanto, a co-cultura de micro-organismos é uma opção que pode melhorar o rendimento do processo fermentativo gerando maior produção de etanol

Dentre os micro-organismos fermentadores, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é de maior aplicação por sua capacidade de consumir hexoses e é geralmente utilizada para produção de etanol.

A *Pachysolen tannophilus* foi a primeira levedura reconhecida por sua capacidade de consumir pentoses na ausência de hexoses e, devido a esta capacidade, ela consegue consumir

os açúcares da biomassa que não foram consumidos pela *S. cerevisiae* durante a fermentação, sem que gere competição pelo substrato. Assim, o processo fermentativo por co-cultura é relevante para a utilização do material lignocelulósico, já que, beneficia o processo de obtenção de etanol.

A imobilização celular é um processo utilizado para aumentar a produtividade dos processos fermentativos, separando as células dos micro-organismos pelo uso de barreiras em processos contínuos de longo período. Nesse processo os micro-organismos imobilizados são protegidos dos efeitos adversos do meio ambiente e permite que os substratos sejam melhor aproveitados. Essa técnica melhora a produção e o rendimento para obtenção bioprodutos.

Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar o pré-tratamento ácido de cascas de arroz para obtenção de açúcares fermentescíveis para serem utilizados como substrato na produção de etanol por culturas individuais e em co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* imobilizadas em alginato de sódio.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a produção de etanol de segunda geração a partir de hidrolisados lignocelulósicos ácidos de cascas de arroz, utilizados como substratos, em co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* imobilizadas em alginato de sódio.

2.2 Específicos

Avaliar o efeito da hidrólise ácida nas cascas de arroz a serem utilizadas como substrato;

Estudar a produção de etanol em hidrolisados das cascas de arroz somente por *Saccharomyces cerevisiae* e somente por *Pachysolen tannophilus* imobilizadas em alginato de sódio;

Estudar a produção de etanol em hidrolisados das cascas de arroz por co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* imobilizadas em alginato de sódio.

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de substrato na produção de etanol de segunda geração utilizando hidrolisados das cascas de arroz para cada levedura e para o consórcio imobilizadas em alginato de sódio.

Utilizar os melhores parâmetros para produção de etanol por fermentação em hidrolisados das cascas de arroz utilizando o consórcio de leveduras imobilizadas em alginato de sódio.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Bioetanol

O Crescimento populacional, em conjunto com a industrialização demanda maior quantidade de energia o que contribui para maior consumo de combustíveis fósseis, que por sua vez, geram maior emissão de gases de efeito estufa promovendo o aquecimento global. Portanto, existe a necessidade de desenvolver ou aperfeiçoar métodos alternativos para obtenção de energia a partir de fontes alternativas, que sejam sustentáveis e renováveis com o meio ambiente (DAFNOMILIS et al., 2017; KÜÜT et al., 2017)

O uso do etanol tem suscitado grande interesse devido à alta dos preços e aos problemas ambientais causados pelos combustíveis fósseis. Trata-se de um produto renovável com características combustíveis, que contribui para a redução do efeito estufa e diminui substancialmente a poluição do ar, reduzindo os seus impactos na saúde pública. Devido à alta no preço do petróleo e preocupação quanto a sua escassez, estimulando assim, processos para a substituição desse tipo de combustível fóssil por biocombustíveis. Esses indicadores têm gerado muitos questionamentos e os países têm discutido ações para amenizar as consequências destas problemáticas. A mistura do bioetanol à gasolina, medida colocada em prática desde 1975 no Brasil, é uma das soluções implantadas para redução das emissões de chumbo (BRINKMAN et al., 2018).

Levantamentos realizados indicam o etanol como principal biocombustível empregado mundialmente corresponde por 10% da energia mundial. No entanto, estimativas realizadas em 2010 indicavam que a demanda mundial do mesmo será de 27% em 2050 (IEA, 2010).

A preocupação sobre a mudança climática global e o aumento do preço do óleo combustível tem estimulado a criação de políticas para obtenção de energia renovável. Os biocombustíveis podem contribuir na redução do consumo de combustíveis fósseis. Portanto, a produção de etanol que é realizada a partir da fermentação dos substratos cana de açúcar e grãos de milho pela *Saccharomyces cerevisiae* no Brasil e nos Estados Unidos, respectivamente. Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol com cerca de 28% (RFA, 2018). Todavia, a indústria de etanol nesses países encontra algumas instabilidades, devido ao estresse causado ao ambiente e ao fato de que competem com áreas utilizadas para a produção de alimentos e, em contrapartida, os biocombustíveis de segunda geração podem ser produzidos de forma barata a partir de resíduos industriais (MALDHURE; EHLE, 2013).

Para que seja vantajosa a utilização destes materiais de origem lignocelulósica na elaboração de bioetanol, estes devem proporcionar alta produtividade, alta concentração de bioetanol durante o processo de destilação e redução na demanda de energia. Para obtenção deste tipo de produto, é mais utilizada a hidrólise ácida em relação a básica, principalmente, quando o material lignocelulósico provém de palha de milho, bagaço de cana de açúcar e palha de arroz. O etanol celulósico reduz em 85 % a emissão de CO₂ quando comparado com a queima da gasolina, diminuindo assim a ocorrência de chuva ácida. No Brasil, 15 % dos automóveis são movidos por etanol (WEI et al., 2014).

3.2 Resíduos lignocelulósicos

Os resíduos lignocelulósicos são gerados por vários tipos de indústrias que utilizam vegetais ou partes destes para elaboração de seus produtos, como por exemplo, papel, alimentos, agrícola, entre outras. Em geral, estes resíduos contêm, de celulose, hemicelulose e lignina (MOOD et al., 2013), como mostra a Tabela 1 (KUMARI, SINGH., 2018).

Esses polímeros naturais possuem grande interesse industrial devido a sua quantidade, sendo os mais abundantes na Terra, eles podem ser facilmente encontrados na biomassa dos resíduos gerados pela indústria. O setor agrícola produz grande quantidade de resíduos lignocelulósicos que são subutilizados ou descartados no meio ambiente, estes descartes por sua vez geram impactos ambientais. Devido a isto, estudos estimulando avanços biotecnológicos tem se tornado cada vez mais importantes, pelo fator econômico e para reduzir os impactos ambientais gerados por esses descartes no meio ambiente (BARUAH et al., 2018).

Tabela 1. Composição centesimal de diferentes resíduos lignocelulósicos.

Biomassa Lignocelulósica	Celulose %	Hemicelulose %	Lignina %
Espiga de milho	33,6	37,2	19,3
Semente de Algodão	80-95	5-20	0
Palha de aveia	39,4	27,1	20,7
Gramíneas	25-40	35-50	10-30
Haste de madeira	40-55	24-40	18-25
Folhas	15-20	80-85	0
Jornal	40-55	25-40	18-30
Casca de nozes	25-30	25-30	30-40
Palha de cereal	39,2	26,1	21,1
Resíduo de espiga de milho	37,5	30	10,3
Palha de arroz	44,3	35,5	20,4
Casca de arroz	34,4	29,3	19,2
Palha do milho	42,6	21,3	10-20
Bagaço da cana	45	20	30

Fonte: KUMARI, SINGH (2018)

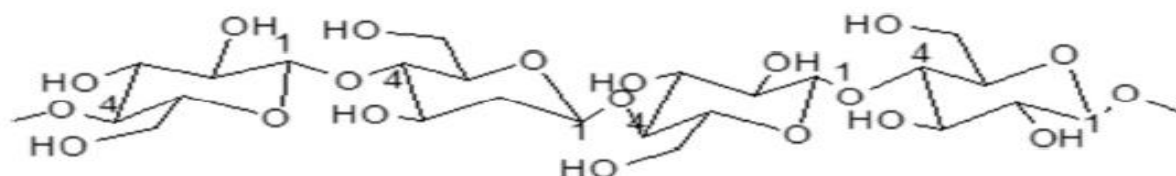
O arroz teve produção anual em 2019 de 795,9 milhões de toneladas, sendo distribuídas entre China (148,5 milhões de toneladas), Índia (116,42 milhões de toneladas), Indonésia (36,7 milhões de toneladas), Bangladesh (34,91 milhões de toneladas) e o Brasil (7,14 milhões de toneladas). Outro importante subproduto gerado durante o beneficiamento do grão é a casca do arroz que gera em torno de 123 milhões de toneladas em todo o planeta (FAO). Portanto, estes resíduos lignocelulósicos possuem grande potencial para produção de bioetanol de segunda geração (KARIMI et al., 2006).

Um dos métodos comumente usados para o aproveitamento destes resíduos é a incineração, com o objetivo de gerar energia para a própria indústria, diminuindo os gastos com energia elétrica, contudo, tal ato gera poluição do ar e problemas à saúde devido à produção de cinzas durante a queima. Outro destino comum da casca de arroz é o descarte em lavagens e fundos de rios, liberando gás metano, contribuindo para o aquecimento global (DELLA et al., 2006; FOLETTO et al., 2005).

Os materiais de origem vegetal apresentam em sua composição três componentes básicos, sendo eles celulose, hemicelulose e lignina. Dentre estes, a celulose tem um papel fundamental por sua aplicação nas indústrias de papel, têxtil, de alimentos, medicina. Contudo, apenas uma

parte desses resíduos lignocelulósicos possuem áreas para sua aplicação, uma vez que, para utilização da celulose destes bio-resíduos é necessário remover a lignina de sua composição (SEWSYNKER-SUKAI, NAOMI DAVID, GUEGUIM KANA, 2020).

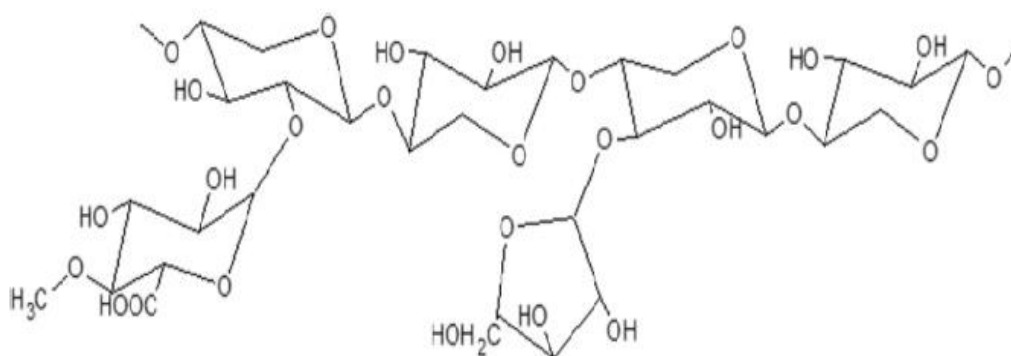
Figura 1: Estrutura linear da celulose.



Fonte: PÉREZ, SAMAIN (2010)

As hemiceluloses formam complexos com *D*-glucose, *D*-galactose, *D*-manose, *D*-xilose, *L*-arabinose, ácido *D*-glucurônico e ácido 4-*O*-metil-glucurônico, por sua vez esses complexos possuem estruturas mais semelhantes a celulose em relação a lignina. As ramificações presentes em sua estrutura compartilham com a celulose de forma eficaz, gerando flexibilidade e estabilidade no agregado. Em comparação, as hemiceluloses possuem maior sensibilidade a hidrólise ácida em relação a celulose, tendo uma maior disponibilidade aos ácidos minerais usualmente utilizados como catalisadores. Esta função é geralmente dada pelo caráter amorfo destes polissacarídeos (FENGEL, & WEGENER, 1989).

Figura 2: Estrutura linear da hemicelulose.

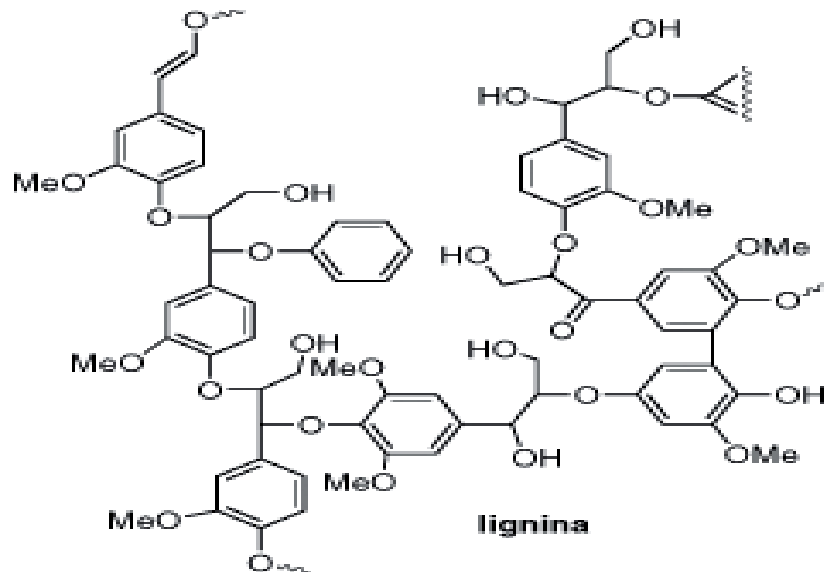


Fonte: CHIARAMONTI (2007)

A estrutura química da lignina contém compostos fenólicos e difere muito da celulose e da hemicelulose que contém compostos sacarídeos. A lignina envolve a celulose tornando-a

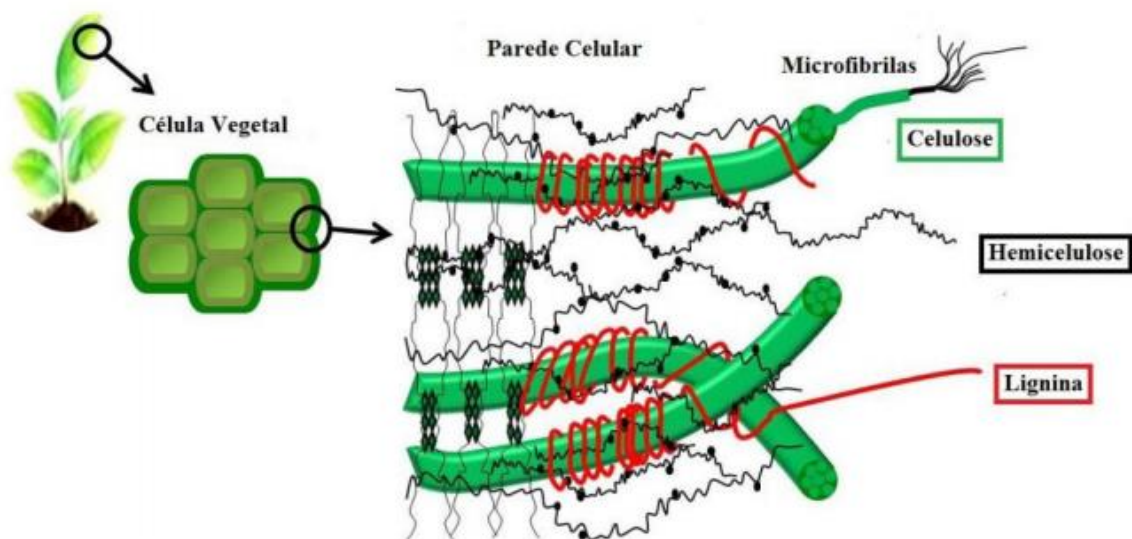
mais hidrofóbica e funciona como uma barreira para as reações químicas na celulose. Por isso, a lignina é mais limitante do que hemicelulose, por esta razão os métodos para obtenção de celulose dos resíduos vegetais são focados na retirada desta (OGEDA; PETRI, 2010).

Figura 3. Estrutura molecular da lignina



Fonte: FERREIRA, ROCHA, SILVA (2009).

Figura 4. Estrutura simplificada da fibra vegetal de materiais lignocelulósicos.

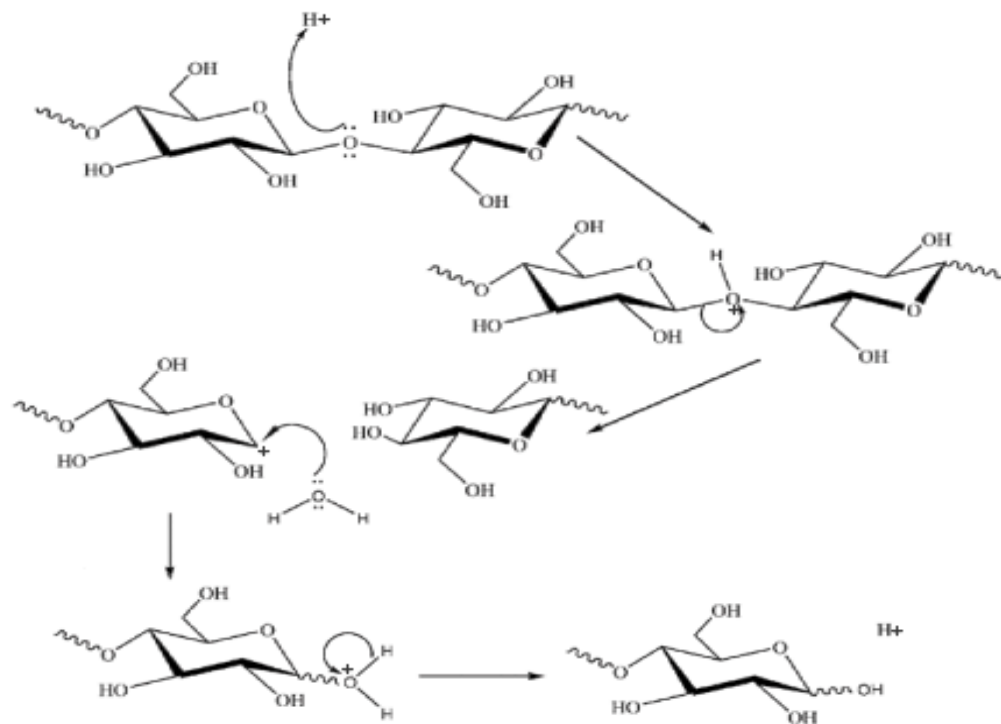


Fonte: TOMME; WARREN; GILKES (1995).

3.3 Hidrólise de resíduos lignocelulósicos

A molécula de celulose está presente em maior quantidade nas paredes celulares de plantas. A celulose se localiza na parte central da estrutura das plantas, a hemicelulose reveste a celulose, que por sua vez, é revestida pela lignina (CASSALES et al., 2011). A hemicelulose se encontra localizada entre a celulose e a lignina. Segundo (LIU et al., 2011) está constituída principalmente por xilose e arabinose que são pentoses encontradas em maior quantidade, e glicose, galactose e manose, que em são hexoses. Depois da glicose, a xilose é o segundo açúcar com maior presença em materiais de origem lignocelulósicos. Desta maneira, a quebra das ligações entre os monômeros que formam estas moléculas libera glicose e xilose e maior parte dos micro-organismos utilizam glicose e somente alguns xilose, no caso das leveduras, utilizam esses carboidratos para produzir bioetanol entre outros.

Figura 5. Esquema de hidrólise ácida da celulose.



Fonte: OGEDA, PETRI (2010)

A presença de carboidratos em resíduos lignocelulósicos é fundamental para seu uso na fermentação. Porém, é necessária a hidrólise destes resíduos, para que seus carboidratos

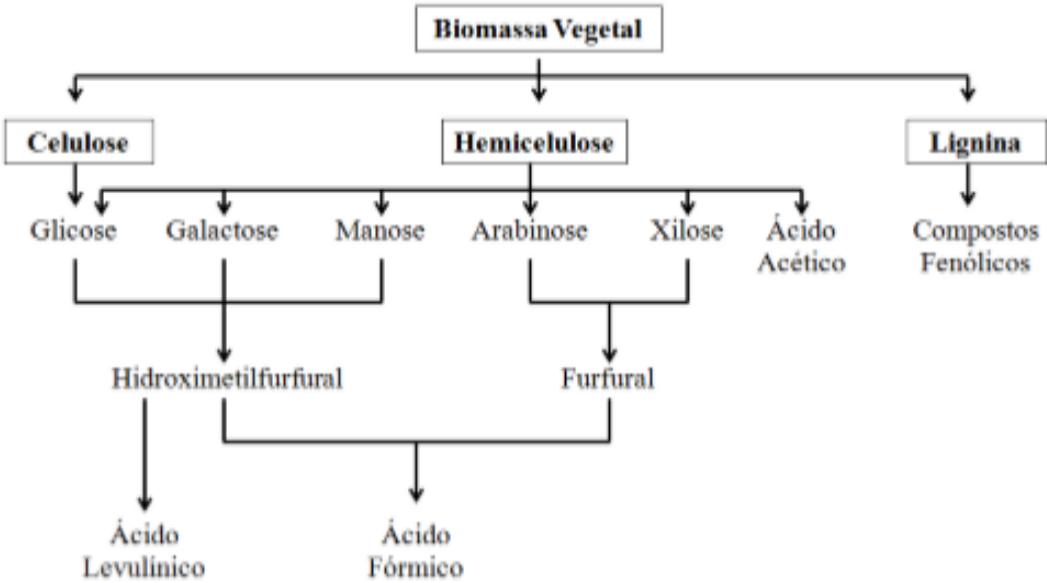
presentes sejam transformados nos monômeros constituintes e estes, por sua vez, sejam utilizados como substrato por micro-organismos que possuam capacidade de realizar a fermentação (SANTOS; GOUVEIA, 2009). A liberação dos açúcares presentes nos resíduos lignocelulósicos pode ser realizada por diferentes tipos de tratamentos, tais como, químico, físico, físico-químico e biológico. Dentre eles no tratamento químico, destacasse a hidrólise ácida e alcalina que podem ser empregadas como pré-tratamentos separadamente ou em conjunto (SUN et al., 2011).

O processo de hidrólise para conversação dos carboidratos em açúcares fermentescíveis tem demonstrado alta eficiência para maioria dos materiais lignocelulósicos. Além disso, este processo pode ser melhorado pelo tratamento da biomassa com vapor de água a alta pressão e com a adição de um ácido em baixas concentrações, por exemplo, ácido sulfúrico ou ácido clorídrico (ZHAO; XIA, 2010).

A hidrólise ácida pode ser realizada com ácidos concentrados ou diluídos. Entre os ácidos que vem sendo utilizados estão clorídrico, fosfórico e nítrico. Porém, o ácido sulfúrico possui maior aplicação devido as suas propriedades características, de quebra da lignina, realizando hidrólise com maior eficácia (MENON; RAO, 2012).

A hidrólise dos resíduos lignocelulósicos para liberação dos açúcares a partir da celulose e da hemicelulose para ação dos micro-organismos libera também compostos que podem afetar a fermentação. A quantidade de compostos e sua natureza variam de acordo com o tratamento efetuado e a origem da biomassa, além das condições do processo fermentativo (CAETANO; MADALENO, 2011). Alguns compostos formados da degradação dos resíduos são inibidores da fermentação e são agrupados em duas classes diferentes: os que derivam do furano (ácidos alifáticos que possuem baixa massa molecular); e os que derivam dos compostos fenólicos. Quando são aplicadas elevadas temperaturas durante processo de hidrólise desses resíduos, os açúcares produzidos são degradados e produzem compostos tóxicos como furano, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, derivados da degradação das hexoses e pentoses respectivamente. Tais compostos inibem a atividade dos micro-organismos pelo fato de danificar as paredes da membrana celular, que por sua vez resulta na redução da atividade e por consequência na redução da produção de etanol (OLEA et al., 2012).

Figura 6: Degradação da biomassa lignocelulósica.



Fonte: PALMQVIST, HAHN-HAGERDAK (2000)

Figura 7: Compostos tóxicos liberados por diferentes tratamentos.

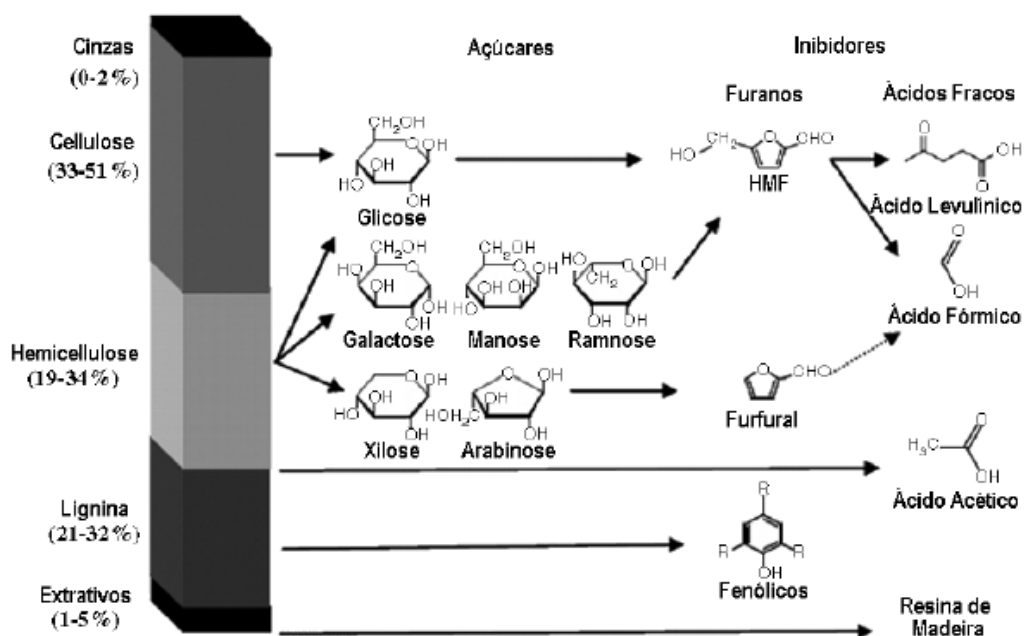
Furano			Pré-tratamento
 5- Hidroximetilfurfural	 Furfural	 Ácido 2-Furóico (*)	-Pré-tratamento ácido; - (*) Oxidação úmida; - Explosão a vapor.
Ácidos Carboxílicos			
 Ácido Acético	 Ácido Fórmico	 Ácido Levulinico	- Explosão a vapor; - Oxidação úmida.
Compostos Fenólicos			
 Vanilina	 Seringaldeido	 Hidroxibenzaldeido	-Pré-tratamento ácido; - Ozonólise; - Explosão a vapor; - (*) Oxidação úmida.
 Ácido Vanílico (*)	 Ácido Seringico	 Ácido 4-Hidrocibenzóico	
 Ácido Cumárico (*)	 Ácido Ferúlico	 Acetoceringona	

Fonte: TOMÁS-PEJÓ et al. (2011)

3.3.2 Hipóteses de inibição por compostos tóxicos

Na produção de etanol a partir de material lignocelulósico, um dos maiores obstáculos é a formação de compostos tóxicos gerados após o pré-tratamento termoquímico destes. Nesta fase são liberados uma grande quantidade de monômeros e, consequentemente formam uma ampla quantidade de compostos tóxicos, que por sua vez podem afetar de forma negativa o comportamento dos micro-organismos durante o processo fermentativo (PARAWIRA et al., 2011).

Figura 8. Composição da biomassa lignocelulósica e os principais derivados da hidrólise.



Fonte: ALMEIDA et al. (2007)

3.3.1.2 Furanos

Estes compostos são gerados após a desidratação dos monômeros de açúcares derivados da celulose e hemicelulose e são considerados como inibidores, sendo eles: furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e os monômeros fenólicos, gerados a partir da lignina, tais como siringaldeído e vanilina; e ácidos orgânicos, tais como ácido acético, derivado de grupos acetila da hemicelulose. Entre os inibidores destacasse o furfural, por estar presente na maioria dos hidrolisados de origem lignocelulosica, como resultado da hidrólise ácida (ALLEN et al., 2010)

Os furanos são gerados, em sua maioria, em pH baixo durante o pré-tratamento termoquímico. O pH alto geralmente propicia a degradação da lignina, ocasionando a formação de monômeros de lignina. Em altas concentrações durante a fermentação o furfural reduz a produção de hidrogênio pelo seu efeito inibidor sobre as enzimas celulares (SIVAGURUNATHAN, 2017).

O furfural foi descrito como inibidor em potencial de enzimas glicolíticas em várias espécies de micro-organismos, sendo ela a levedura produtora de etanol *Saccharomyces cerevisiae*. Nesta levedura, podem ser notados danos celulares as mitocôndrias, cromatina e oxigênio pela presença de furfural (SAMBUSITI, 2015).

3.3.1.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são provenientes principalmente da degradação da lignina, são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio, provocando assim interferência negativa no metabolismo celular. O acúmulo de moléculas hidrofóbicas dos compostos aromáticos se agrupa na membrana plasmática, ocasionando um aumento no fluxo da membrana, aumentando o influxo de prótons (SOARES et al., 2016).

A grande quantidade destes compostos pode gerar inibição no crescimento celular, consequentemente restringir a produção de etanol, além de prolongar a fase *lag*. Contudo, estudos demonstram que o processo de desintoxicação auxilia na diminuição de compostos fenólicos, aumentando a taxa de crescimento e produção de etanol (FERREIRA et al., 2018).

3.3.2 Desintoxicação

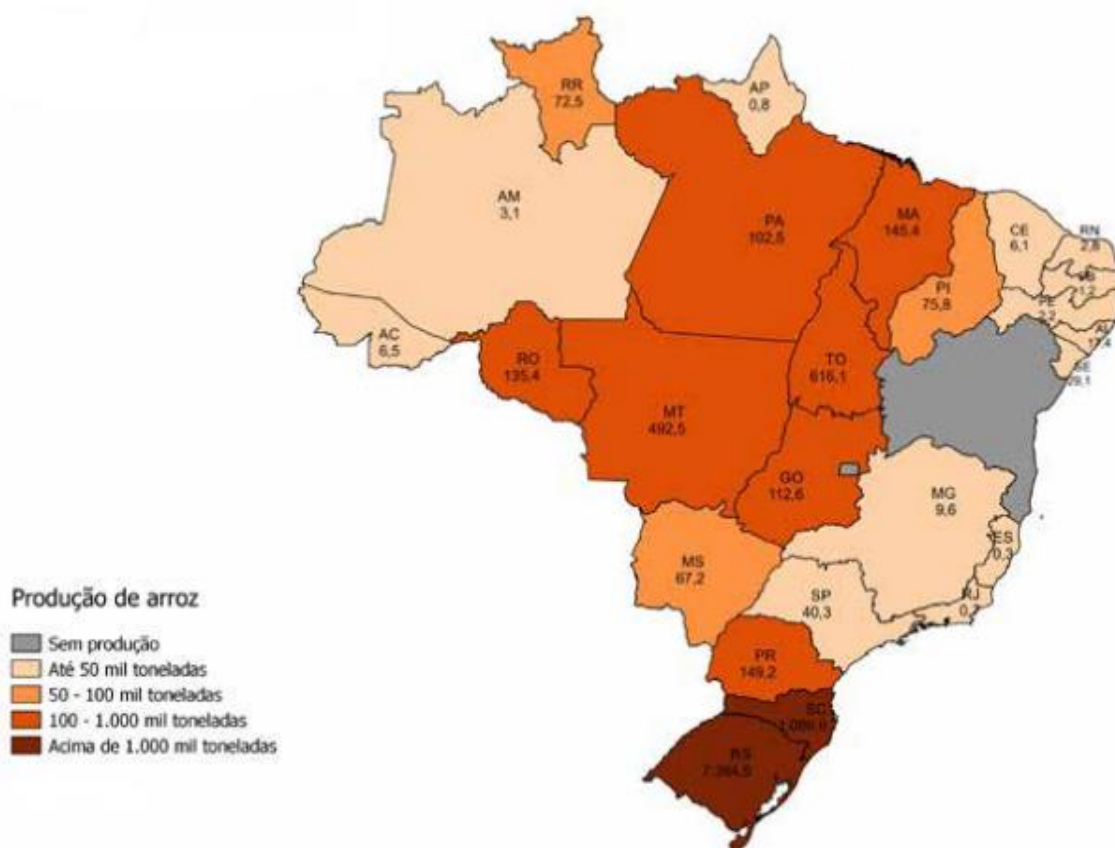
A etapa de desintoxicação é necessária para evitar ou diminuir a presença de compostos fenólicos. Esta etapa é importante, visto que, quanto menor a quantidade desses compostos, melhor será o processo fermentativo e maior seu rendimento, devido a menor inibição da atividade microbiana, que por sua vez, evita a diminuição do processo de conversão dos açúcares dos resíduos aumentando a produção de etanol (THANGAVELU et al., 2019).

Diversos estudos têm utilizado carvão ativado em pó na etapa de desintoxicação do hidrolisado ácido do material lignocelulósico para produção de etanol de segunda geração. Este método de desintoxicação realiza a adsorção dos compostos tóxicos diminuindo a presença destes; é muito eficiente, principalmente, quando se utiliza em conjunto temperatura, tempo e pH na remoção destes inibidores e baixo custo (CAVKA et al., 2015).

3.4 Casca de arroz

A casca do arroz é um resíduo obtido a partir do processamento do arroz, em média ele representa a 23% do peso total do grão e tem uma estimativa de produção de 265,9 milhões de toneladas no Brasil, sendo 3,5% maior em relação à safra 2019/2020 (CONAB). Por sua vez, este gera um resíduo apresenta elevada dureza, elevada quantidade de fibras de origem abrasiva, gerando assim produtos com propriedades nutritivas em menor quantidade, e alto teor de cinzas. Geralmente se usa em incineração para gerar energia para a indústria e as cinzas são utilizadas em plantações como fertilizantes. Contudo, o carbono residual presente nas cinzas é muito tóxico provocando danos à saúde e ao meio ambiente. Apresentando 18% do peso total das cinzas possui alto valor econômico, para a sua aplicação na indústria. (SAHA; COTTA, 2008; DELLA et al., 2006).

Figura 9: Mapa da produção agrícola no Brasil em 2019/2020



Fonte: CONAB

3.5 Micro-organismos produtores de bioetanol

Tradicionalmente, têm sido utilizadas bactérias, fungos e leveduras nos processos fermentativos destes, as leveduras são agentes da fermentação alcoólica muito eficientes. Elas crescem bem em meio ácido e são anaeróbias facultativas (NITZKE; BIEDRZYCKI, 2012).

A conversão de uma quantidade de açúcar da biomassa, em dióxido de carbono, água e etanol em anaerobiose é conhecida como fermentação alcoólica. Os carboidratos são essenciais para o processo fermentativo e podem ser endógenos por constituir a própria reserva energética da levedura, tais como glicogênio ou exógenos que são consumidos pelas leveduras, sendo eles sacarose, glicose, frutose entre outros (AQUARONE et al, 2001).

A fermentação alcoólica da glicose, gerada a partir da hidrólise ácida dos carboidratos, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, apresenta a melhor resposta para conversão de glicose em etanol, maior produtividade e maior tolerância alcoólica. Este micro-organismo apresenta maior eficiência para esse processo, motivo pelo qual se utiliza em larga escala para fermentações industriais, desde que os inibidores sejam controlados para minimizar os impactos durante a fermentação e para que o processo ocorra sem problemas (ZHU et al, 2005).

A fermentação alcoólica se inicia em valores de pH altos e termina com valores menores. Quando realizada em meios mais ácidos, esse processo apresenta melhor resultado para produção de etanol pelas limitações impostas para o desenvolvimento da levedura, diminuindo a produção de glicerol, bem como, a contaminação bacteriana no processo de fermentação (FERREIRA, 2018).

O processo fermentativo das pentoses é realizado por poucos micro-organismos que possuem a aptidão para convertê-las em etanol. Dentre essas, três espécies se destacam pela maior eficiência na conversão alcoólica das pentoses *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*. Isso se deve ao fato que as pentoses para serem incorporadas na glicólise necessitam da presença de oxigênio em concentrações baixas, assim como, as enzimas necessárias para serem incorporadas no processo de fermentação. (NAUMOVA et al, 2005).

3.5.1 *Pachysolen tannophilus*

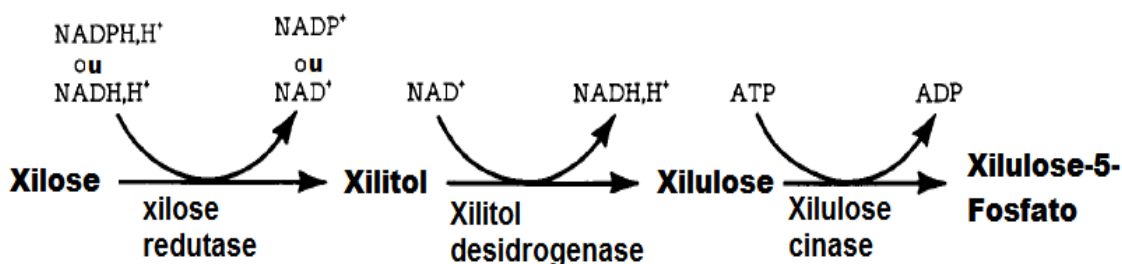
A levedura *Pachysolen tannophilus* foi a primeira levedura identificada por sua capacidade significativa para converter xilose em etanol. A *P. tannophilus* pode fermentar todos os açúcares comuns, exceto a L-arabinose (BOIDIN E ADZET, 1957). Foi isolada pela primeira vez a partir de extratos de madeira (SLININGER, et al., 1987) e passou a atrair a

atenção dos pesquisadores devido a sua capacidade de utilizar xilose para produção de etanol (SALEH et al., 2014; SATHESH-PRABU; MURUGESAN, 2011; FU, PEIRIS, 2008).

A *P. tannophilus* cresce em meio contendo glicose, galactose, xilose e frutose, mas não utiliza sacarose e nem lactose como fonte de carbono (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994). Além disso, na fermentação de um meio contendo hexoses e pentoses, a levedura tem preferência pela hexose e o consumo de xilose inicia-se somente após a exaustão da glicose (ZHAO et al., 2008).

A levedura gera diferentes mecanismos adaptativos de resposta ao estresse, como uma forma para se adaptar e sobreviver em condições hostis, nesses casos podem incluir choques de pH e temperatura; toxicidade de produtos de fermentação; estresse oxidativo e choque osmótico. Diferentes estudos relatam que o dano às células causados no estresse oxidativo pode ser causado pelo etanol (LIU et al., 2012).

Figura 10. Conversão de xilose em xilulose 5-fosfato por *P. tannophilus* por meio de três reações enzimáticas reversíveis que requerem cofator.

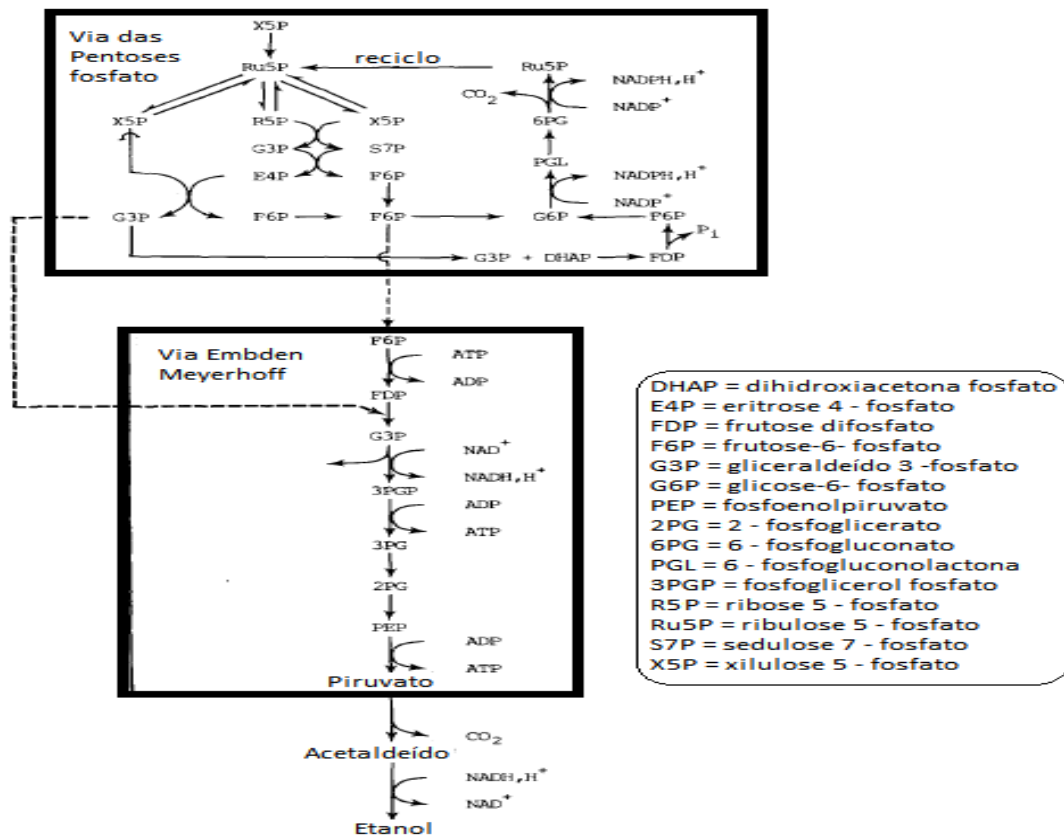


Fonte: SLININGER et al, (1987).

Uma vez que a xilulose-5-fosfato é formada a partir de xilose (Figura 10), seu metabolismo envolve três grandes sistemas enzimáticos, incluindo a fosfato pentose, a Via Embden-Meyerhoff e a Via dos ácidos tricarboxílicos (SLININGER et al., 1987).

A rota metabólica empregada pelos micro-organismos para a conversão de xilose em etanol (Figura 11) a xilose é direcionada para interior da célula, sendo reduzida a xilitol pela enzima xilose redutase (XR), com ajuda das coenzimas NADH e NADPH (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994).

Figura 11. Rota metabólica empregada por *P. tannophilus* no metabolismo de pentoses. Representa a via das pentoses fosfato e a via Embden-Meyerhoff.



Fonte: SLININGER et al. (1987).

3.5.2 *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura mesofílica, suas colônias são de cores que variam entre o branco e o creme, e suas estruturas podem ser convexas ou lisas (WALKER, 1998). A *S. cerevisiae* é a levedura mais utilizada no mundo para a produção de etanol em escala industrial e em uma série de outros processos biotecnológicos, como, por exemplo, a fabricação de pão, produção de bebidas alcoólicas, como cerveja e vinho (HIRASAWA et al., 2010; BEHERA et al., 2010). A *S. cerevisiae* codifica a enzima invertase. Assim, a fermentação alcoólica ocorre em anaerobiose, e a invertase promove a hidrólise da sacarose em frutose e glicose. Desta forma, a glicose segue na via da fermentação alcoólica, passando por várias reações específicas até dar origem ao etanol (Figura 12). (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000; LIMA et al., 2001).

Leveduras que possuem características floculante são desejáveis, por pouparem investimentos e manutenção em equipamentos, tal como consumo de energia em algumas operações. Esta característica em uma levedura é de grande relevância, pois, aumenta a

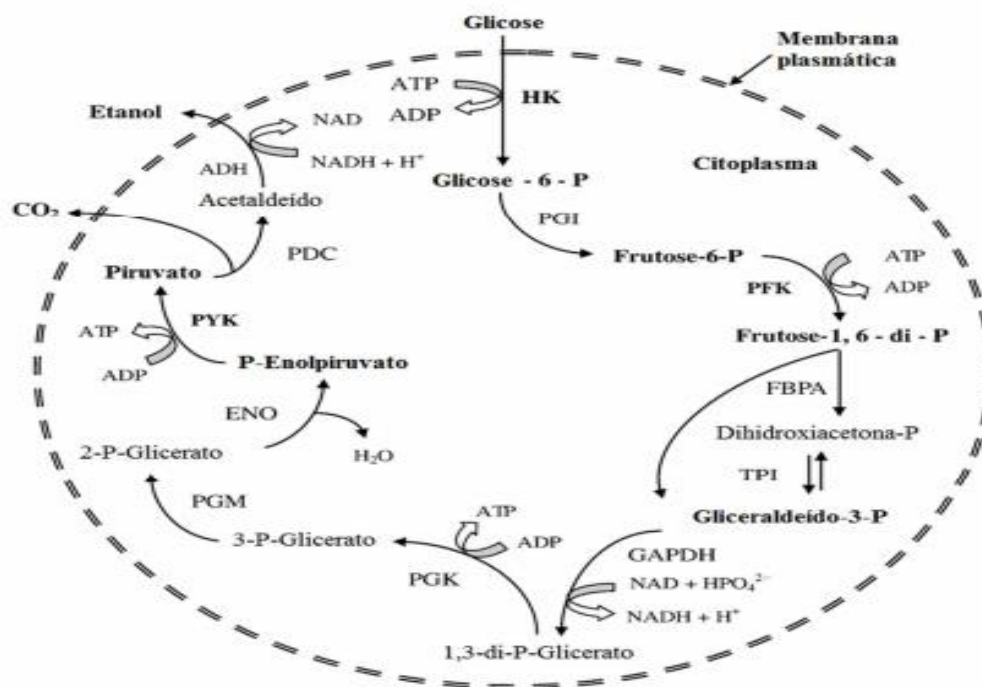
capacidade das células se agrupar de forma espontânea e formar flocos que são sedimentados ao final da fermentação de maneira mais eficiente (ELSAIED et al., 2018)

A floculação das leveduras apresenta diversos benefícios, como por exemplo, aproveitamento em reatores com alta densidade celular, que promove uma fermentação de menor tempo e com maior rendimento. As leveduras de caráter floculante têm sido empregadas em indústrias de cervejas e vinhos há muitos anos e sua utilidade nesses processos tem sido muito estudada. Contudo sua aplicação para diferentes áreas do processo de fermentação alcoólica, ainda demanda estudo e desenvolvimento (PULIGUNDLA et al., 2020)

A levedura *S. cerevisiae* é geralmente empregada devido à sua grande eficiência para produção de etanol e sua resistência a concentrações deste o que resulta em uma diminuição de custos no processo de destilação nas usinas. Além disso, a levedura tolera baixos valores de pH e oxigênio e elevadas concentrações de açúcares (TABANAG et al., 2018)

Algumas linhagens desta levedura foram selecionadas para serem utilizadas no setor sucroenergético, pelo fato de apresentarem alta produtividade no processo fermentativo durante o período de safra e são comercializadas desde o final da década de 1990 (CHRISTOFOLETI-FURLAN et al., 2020).

Figura 12. Rota metabólica de fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: BAI et al. (2008)

Contudo a *S. cerevisiae* não possui aptidão para de assimilar xilose, que faz parte da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol, devido à ausência de enzimas essenciais para a conversão de xilose em etanol. Portanto, é necessária a presença de outros micro-organismos que possuem essa capacidade de utilizar xilose e, o processo em co-fermentação pode suprir esta lacuna. Além das leveduras *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* existem cepas geneticamente modificadas capazes de produzir etanol utilizando xilose (BEHERA et al, 2010).

3.5.3 Consórcio de micro-organismos

O consórcio de micro-organismos ou simplesmente co-fermentação é relatado como um processo capaz de obter melhores resultados para produtividade de etanol do que apenas realizar o processo fermentativo tradicional (SHADBAHR et al., 2017). Este tipo de fermentação pode ser realizado em um único biorreator, consequentemente gera menores custos operacionais e, também apresenta menos problemas que causam inibição pelo substrato, tendo em vista que os açúcares fermentáveis são consumidos pelo consórcio durante a produção de etanol. Contudo, neste processo devem ser considerados alguns parâmetros ideais como fermentação e sacarificação simultâneas para obter uma co-fermentação eficiente (SHADBAHR et al., 2017 ; TRAKARNPAIBOON et al., 2017).

Para que ocorra a fermentação dos substratos deve ser realizado um pré-tratamento eficiente, desta maneira, a co-fermentação é considerada como processo ideal para produção de etanol. A co-fermentação oferece várias vantagens: como eliminação da inibição devida aos subprodutos da hidrólise da celulose e redução do tempo de processo. Pois os micro-organismos podem converter a glicose liberada em etanol com maior eficiência (TRAKARNPAIBOON et al., 2017).

3.5.4 Imobilização celular

Os micro-organismos possuem a capacidade de serem incorporadas em matrizes porosas onde suas células não disseminam no meio, a imobilização celular é uma técnica que reproduz esta capacidade. De tal forma, um processo de forma contínua utilizando células imobilizadas necessita de um volume de reação menor que um processo em lote, reduzindo assim os custos operacionais (KOURKOUTAS et al., 2004). Estudos relatam que a imobilização eleva a produtividade do reator, auxilia na separação de células do líquido e melhora o processo

contínuo por um período prolongado. Grande parte dos processos de produção de etanol é limitada por uma produção baixa de etanol e um dos problemas deve-se a separação e reciclagem dos micro-organismos utilizados durante o processo. Em um processo contínuo, a utilização das células imobilizadas aumenta a densidade celular dentro do biorreator. A fermentação continua com células imobilizadas reduz os custos e aumenta a eficiência de produção de etanol (XUE et al., 2020).

Este processo melhora as propriedades metabólicas dos micro-organismos, permitindo o aumento do crescimento, resistência a inibidores e maior efetividade biocatalítica. Além disso, os imobilizados possuem maior tolerância as adversidades ambientais e são menos suscetíveis as substâncias tóxicas presentes na fermentação continua (GANDU et al, 2020)

3.6 Alginato de sódio

O alginato de sódio é um biopolímero natural extraído de algas de coloração escura, sendo um polissacarídeo linear e heterogêneo. Tal biopolímero é conhecido como biodegradável e não gera riscos ao meio ambiente. Este biopolímero possui grupos carboxílicos que auxiliam os materiais sensíveis ao pH. Em hidrogéis a base de alginato de sódio são comumente utilizados íons de cálcio. Entretanto, íons de cálcio são instáveis na presença de sais, portanto, torna-se necessário estabilizá-los. Para isto, podem ser utilizados diferentes grupos funcionais como amino, carboxila e hidroxila. Estes geram mudanças junto com outros polímeros fornecem vários produtos com propriedades químicas e mecânicas desejadas (VARAPRASAD et al., 2020).

O cultivo de algas marinhas marrom é responsável pela maior parte da produção de alginato, contudo, bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter* também possuem a capacidade de produzir alginato, sua estrutura é semelhante ao produzido por estas algas. (GARCIA-CRUZ et al., 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Biopolímeros do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP, em São José do Rio Preto/SP.

4.1 Resíduo industrial de arroz

O resíduo industrial de arroz constituído por cascas foi obtido no comercio local de São José do Rio Preto, São Paulo. A matéria prima não necessitou ser seca ou reduzido o tamanho de partícula, devido as características que já se encontravam.

4.2 Hidrólise ácida das cascas de arroz

A hidrólise foi realizada com ácido sulfúrico nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0% (v/v), com e sem aquecimento, em triplicata. Para isto, foram pesados 10g da casca de arroz, previamente triturada, em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do ácido nas diferentes concentrações. Os hidrolisados tratados com aquecimento foram mantidos em autoclave a 121°C 1kgf/cm² nos tempos de 5, 10 e 15 minutos.

Ao final de cada hidrólise com aquecimento, os frascos Erlenmeyer contendo o hidrolisado foram deixados em temperatura ambiente até resfriamento, e então o pH foi ajustado para 6,5 e 7,0 com hidróxido de sódio 50% (m/m). Cada hidrolisado foi centrifugado a 5000g por 20 minutos, para separação dos resíduos remanescentes e, após foram filtrados em papel de filtro Whatman nº 1 para remoção completa dos resíduos da casca de arroz (torta remanescente). Todos os filtrados foram armazenados em frascos com tampa abaixo de 0°C. Durante o preparo dos meios para fermentação, os hidrolisados foram concentrados em banho-maria a 60°C até atingirem a concentração desejada, quando necessário. Em cada hidrolisado foram determinados os açúcares totais (DUBOIS *et al.*, 1956); açúcares redutores (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952) e compostos fenólicos (CHAOVANALIKIT, WROLSTAD, 2004).

4.2.1 Desintoxicação

Neste procedimento foi utilizado carvão ativado em pó na proporção de 1g para cada 40g de hidrolisado. A mistura foi agitada em incubadora orbital refrigerada (*Shaker*) durante 1 hora a 200 rpm e 30°C, centrifugada a 2000g por 30 minutos e posteriormente filtrada em papel de filtro Whatman nº 1. Foi realizada então a análise de açúcares redutores (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952); compostos fenólicos (CHAOVANALIKIT, WROLSTAD, 2004) e açúcares totais (DUBOIS *et al.*, 1956); antes e após cada etapa de desintoxicação. Por fim, o sobrenadante obtido foi armazenado em temperatura abaixo de 0°C, para uso subsequente no meio fermentativo.

4.3 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram as leveduras *Pachysolen tannophilus* CCT 1891, adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, SP e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 cedida pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra de Portugal.

4.3.1 Meios de manutenção

As leveduras cresceram em estufa a 30°C por 24 h no meio de manutenção especificado na Tabela 2 e foi realizado um estoque de trabalho armazenado em freezer para retiradas periódicas durante toda a pesquisa.

Tabela 2 - Meio de manutenção das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891.

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	10,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Peptona de carne	5,0
Ágar	20,0

Fonte: elaborado pelo autor.

4.4 Preparo do pré-inóculo

As cepas de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* foram inoculadas em tubos de ensaio inclinados contendo 10 mL do meio de manutenção, conforme descrito no item 4.3.1, e incubados em estufa a 30°C, por 24 h. Cada tubo foi adicionado de 5 mL alginato de sódio estéril e, com o auxílio de uma alça de platina foi retirada a massa microbiana do tubo. A seguir, os mesmos foram vertidos em 100 mL de alginato de sódio, previamente esterilizado.

4.5 Imobilização celular - aprisionamento das células em gel de alginato

As células de *S. cerevisiae* ATCC 26602 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 nas condições pré-estabelecidas foram adicionadas em uma solução de alginato de sódio 2,0% (Dinâmica), previamente preparada e esterilizada, sob agitação por 15 minutos. Após, a mesma foi gotejada (utilizando uma bomba peristáltica) em uma solução de cloreto de cálcio 3,0% (Sigma) sob agitação, obtendo-se esferas de alginato de cálcio contendo o micro-organismo com aproximadamente 2,5 mm de diâmetro e peso de 0,06 g; mantidas por 30 minutos sob agitação, após este período, foram adicionados 3 gramas destas esferas a cada um dos meios de fermentação, definido por Trinca et al. (2017).

4.6 Meios de fermentação

4.6.1 Meio sintético

O meio sintético foi semelhante ao definido por Rodríguez e Callieri (1986), com algumas modificações, conforme especificado na Tabela 3.

Os ensaios padrão foram realizados usando soluções de glicose em diferentes concentrações. A solução de açúcares foi esterilizada separadamente a 121°C, por 15 min, e depois de resfriada a temperatura ambiente, foi misturada assepticamente no meio sintético, previamente preparado e esterilizado, de forma a obter-se um meio de glicose na concentração desejada.

Tabela 3 - Composição do meio sintético.

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Extrato de levedura	5,0
KH ₂ PO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0

Fonte: elaborado pelo autor.

4.6.2 Meio contendo os resíduos hidrolisados da casca de arroz

Os hidrolisados desintoxicado e sem desintoxicação foram padronizados com base na concentração de açúcares redutores. As concentrações foram iguais às utilizadas com glicose. Os caldos hidrolisados nas diferentes concentrações de açúcares redutores e foram esterilizados separadamente a 121°C, por 15 min., resfriados a temperatura ambiente e então adicionados ao meio sintético, previamente preparado e esterilizado.

4.7 Condições de fermentação

As fermentações para produção de bioetanol ocorreram em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL dos meios de cultura e aproximadamente 3g de esferas de alginato de sódio contendo as leveduras imobilizadas. Os experimentos foram realizados com cada levedura, *S. cerevisiae* ATCC 26602 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891, e depois com o consórcio destas mesmas.

4.7.1 Avaliação das variáveis que podem influenciar a produção de etanol pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus*.

A determinação das condições de trabalho das leveduras foi realizada utilizando meio sintético acrescido de glicose em diferentes concentrações, durante uma fermentação de 14 horas retirando amostras a cada duas horas.

O melhor tempo de fermentação foi determinado a partir de fermentação estática (sem agitação) e com agitação (50 e 100 rpm), para isto, as amostras foram incubadas em estufa B.O.D a 30 °C ou em incubadora refrigerada com agitação com temperatura controlada a 30°C; após cada tempo de fermentação foi determinado o pH final, açúcares totais (DUBOIS *et al.*,

1956) e crescimento celular. O restante do meio foi centrifugado a 3600 rpm por 15 min para separação das células, foi recolhida uma alíquota para análise de etanol. O experimento foi realizado em triplicata.

4.7.2 Avaliação das fermentações utilizando os hidrolisados

As fermentações utilizando os hidrolisados desintoxicados e sem desintoxicação foram realizadas em condições semelhantes às descritas no item 4.7.1.

Para produção de etanol foram utilizados os hidrolisados com a maior concentração de açúcares redutores. Foram realizadas fermentações sem agitação, com pH inicial de 6,5, incubando os hidrolisados em estufa B.O.D a 30°C ou em incubadora refrigerada com agitação com temperatura controlada a 30°C, durante 24h colhendo-se amostras após 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas de fermentação. O pH e crescimento celular foram determinados em cada um destes tempos, assim como retiradas amostras, após centrifugação a 3600 rpm por 15 min para separação das células, para efetuar a análise de etanol e açúcar residual (totais). O experimento foi realizado em triplicata.

4.8 Métodos analíticos

4.8.1 Determinação do pH final

O pH final foi determinado diretamente no caldo fermentado por potenciometria utilizando um pHmetro Digimed modelo DM20.

4.8.2 Determinação de etanol

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

temperatura de 40°C (até atingir o equilíbrio). Para quantificação foi criada uma curva de calibração.

4.8.3 Determinação de açúcares totais (AT)

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

4.8.4 Determinação de açúcares redutores (AR)

Os açúcares redutores (AR) foram determinados de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Nelson (1944) e Somogyi (1952). Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda de 540 nm, e a quantificação foi determinada por curva padrão de glicose utilizando diferentes concentrações.

4.8.5 Determinação do teor de compostos fenólicos

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada pelo do método de Folin-Ciocalteu modificado por Chaovanalikit e Wrolstad (2004). Uma amostra de 0,5 mL do hidrolisado foi misturada com 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de água destilada. A mistura deixada em repouso por 10 min, à temperatura ambiente. Depois foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio (20%); as amostras ficaram em repouso novamente por 20 min à temperatura ambiente. Posteriormente foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda de 755 nm para a construção de uma curva de calibração.

4.8.6 Cálculo da produtividade

Os valores de produtividade total de etanol, expressos em massa do produto formado por unidade de tempo e por unidade de volume (g.L⁻¹.h⁻¹), foram obtidos por meio da Equação 1.

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

Onde:

P = produtividade (g.L⁻¹.h⁻¹);

Po= massa produto inicial (g.L⁻¹);

Pf = massa de produto final (g.L⁻¹);

tf= tempo final de fermentação (h);

to = tempo inicial de fermentação (h);

4.9 Análise estatística

A análise dos resultados e os efeitos principais e interações entre as variáveis do planejamento fatorial foram realizados utilizando o programa computacional Minitab 16 Statistical Software e Statistica 7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padronização da hidrólise ácida da casca de arroz

Foram realizadas análises para determinar o melhor tempo de contato das diferentes concentrações de ácido sulfúrico com a biomassa lignocelulósica obtida da casca de arroz. No término de cada ensaio de hidrólise ácida foram determinadas a concentração de açúcares totais, açúcares redutores e compostos fenólicos, com e sem o emprego de temperatura. Com base nessas determinações foi escolhida a concentração de hidrolisado que proporcionou a maior quantidade de açúcares que utilizasse a menor concentração de ácido após aquecimento durante 10 minutos em autoclave a 121°C e 1 kgf/cm².

Algumas determinações não possuem diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as diferentes concentrações de ácido utilizadas para extração de açúcares presentes na biomassa, desta forma foi selecionada a que utilizasse menor tempo de processo e menor concentração de ácido, para que assim pudesse oferecer maior economia nos custos visando uma possível aplicabilidade em nível industrial (Tabela 4).

A hidrólise selecionada foi concentração de H₂SO₄ de 2% (v/v), com o uso de autoclave (121°C e 1 kgf/cm²) durante 10 minutos. Esta, mostrou estatisticamente ($P < 0,05$) os melhores resultados, tendo maior liberação de açúcares redutores (33,0 mg/mL), os quais são necessários para a fermentação (Figura 13). Thomas-Pejo et al. (2011) ressaltaram a importância do uso de ácido em baixas concentrações durante o processo devido à corrosão de equipamentos, necessidade de neutralização ao descartar, uma vez que, demanda o uso de maior quantidade de reagentes para neutralizar o pH posteriormente ao processo da hidrólise ácida, além de reduzir a quantidade de compostos tóxicos o que inibe o processo fermentativo (THOMAS-PEJO et al., 2011).

A Tabela 4 mostra o valor de significância estatisticamente ($P < 0,05$), das análises de açúcares totais, redutores e compostos fenólicos realizadas em relação aos parâmetros temperatura, tempo e concentração de ácido. A variação para P -valor menores que 0.05.

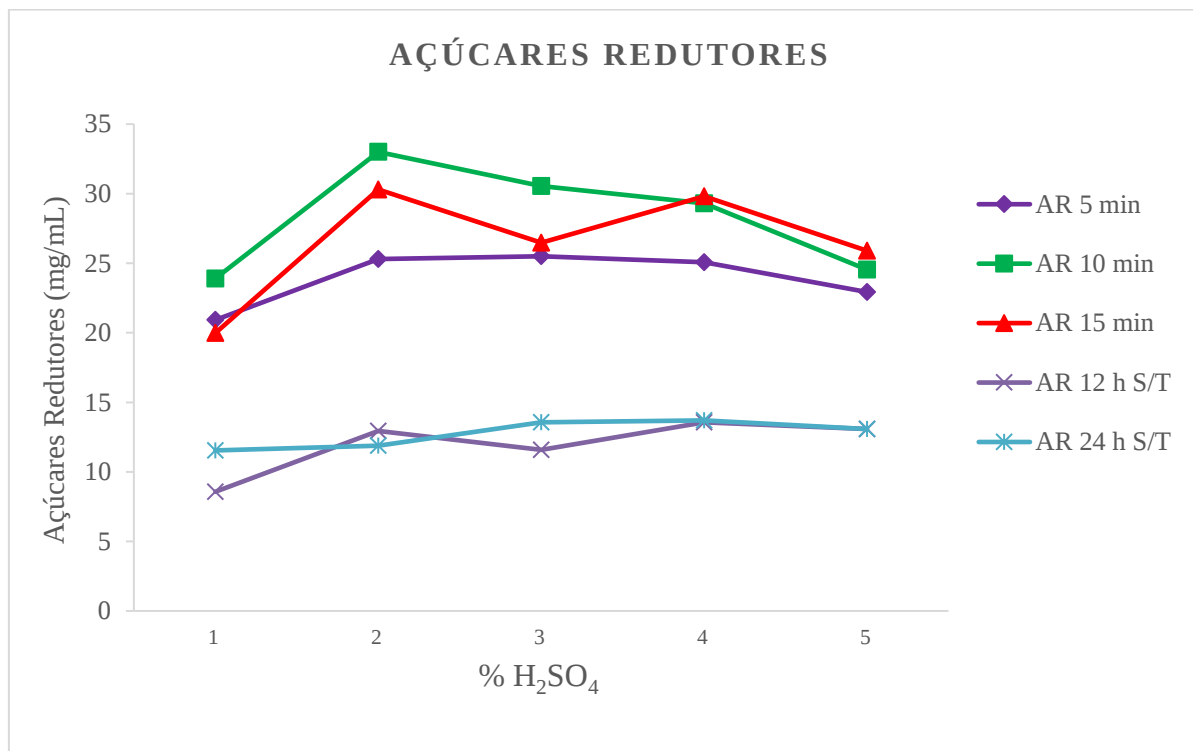
Tabela 4. Relação entre as variáveis tempo, temperatura e concentração de ácido. Em relação as análises de açúcares totais, redutores e compostos fenólicos pela análise ANOVA.

Variáveis	P - Valor
Açúcares totais x Tempo	0,000
Açúcares totais x Temperatura	0,000
Açúcares totais x Ácido	0,847
Açúcares redutores x Tempo	0,000
Açúcares redutores x Temperatura	0,000
Açúcares redutores x Ácido	0,521
Compostos fenólicos x Tempo	0,000
Compostos fenólicos x Temperatura	0,000
Compostos fenólicos x Ácido	0,958

Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 13 mostra a quantidade de açúcares redutores disponíveis após o processo de hidrólise em diferentes tempos, concentrações de ácido sulfúrico, com utilização e ausência de aquecimento por autoclave. Nesta Figura 13 é possível observar a maior presença de açúcares redutores (33,0 mg/mL) na concentração de 2% (v/v) de ácido, durante 10 minutos de aquecimento da amostra. Portanto, estes parâmetros foram utilizados como padrão para hidrólises posteriores, tendo em vista menor quantidade de ácido utilizado e menor tempo de aquecimento, além de maior rendimento, em comparação com outros tempos e concentrações testadas. Ainda foi possível verificar a necessidade da utilização de temperatura, pois, nas determinações com ausência de aquecimento os valores de açúcares redutores foram muito abaixo dos que tiveram o emprego deste.

Figura 13. Açúcares redutores obtidos durante hidrólise ácida com e sem uso de temperatura (121°C e 1 kgf/cm²) nos tempos de aquecimento de 5, 10 e 15 minutos; 12 e 24 horas.



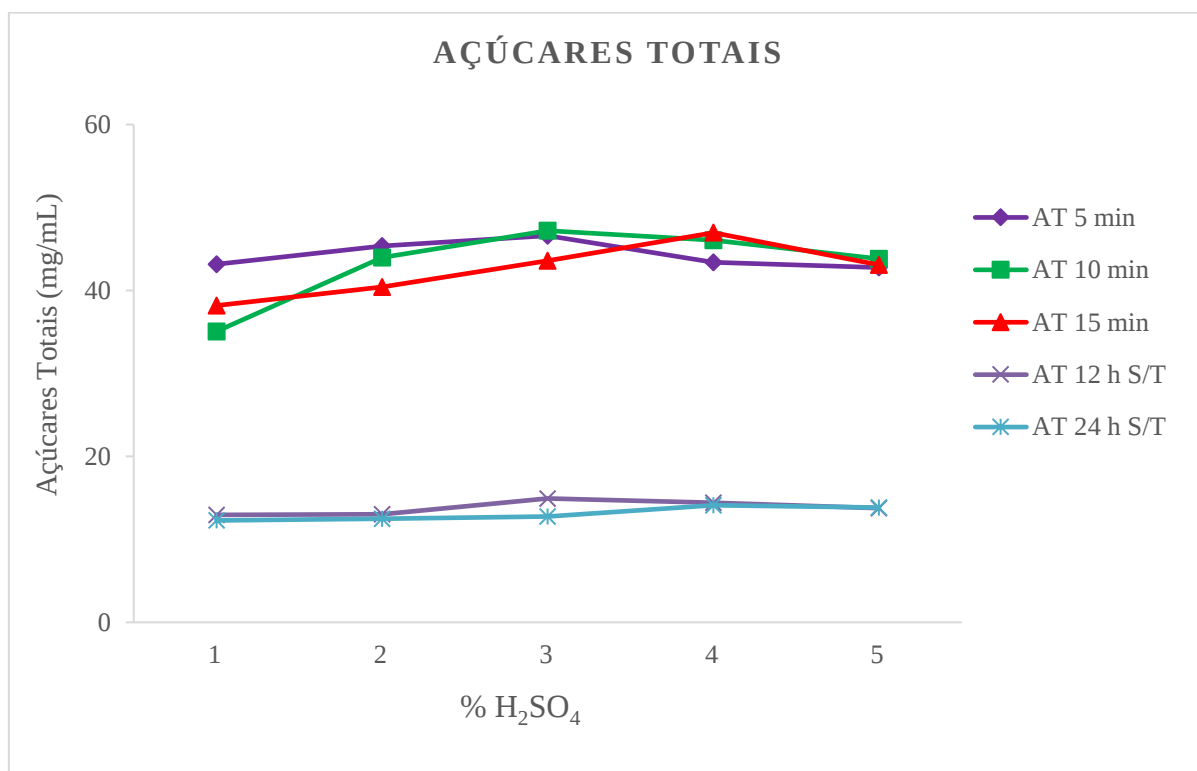
Fonte: elaborado pelo autor.

As quantidades de açúcares totais liberados durante a hidrólise estão mostradas na Figura 14, os parâmetros utilizados foram os mesmos da análise de açúcares totais (Figura 13). Nesta é possível observar que a maior liberação foi de 47,2 mg/mL na concentração de 3% (v/v) de H₂SO₄ com aquecimento de 10 minutos. Contudo, a escolha da padronização de 2% (v/v) foi devida a maior produção de açúcares redutores, além de possuir a maior facilidade pela menor quantidade de ácido para a neutralização após o processo, o que talvez possa gerar uma diminuição nos custos e podendo facilitar uma maior utilização em nível industrial. Cabral (2016) ressalta a utilização da concentração de 2% em 10 minutos de aquecimento para hidrólise de casca de mandioca, os resultados de açúcares obtidos pela autora foram superiores aos obtidos nesse estudo, sendo eles 134,84 mg/mL (AR) e 254,86 mg/mL (AT), porém em sua hidrólise não foi utilizada água, devido a que a composição do resíduo ocasionou a gelatinização do amido pelo uso de aquecimento em altas temperaturas.

Em 2014, Moscon et al, utilizaram a concentração de 18,8% (v/v) com aquecimento de 65 °C, para hidrólise ácida de casca de arroz e obteve 113 mg/mL de açúcares redutores. Na tentativa de melhorar o rendimento da hidrólise, os autores utilizaram ultrassom e diminuíram a concentração de ácido sulfúrico para 15% (v/v) e a temperatura para 45°C obtendo a

quantidade de 162 mg/mL. Estas alterações promoveram um rendimento 43% maior que a hidrólise ácida convencional. Entretanto, as alterações promovidas pelo uso de ultrassom tornaram o processo mais caro, além de que, as concentrações de ácido utilizadas são muito altas se comparadas com nosso trabalho.

Figura 14. Açúcares totais obtidos durante hidrólise ácida com e sem uso de temperatura elevada (121°C e 1 kgf/cm²) nos tempos aquecimento de 5, 10 e 15 minutos; 12 e 24 horas.



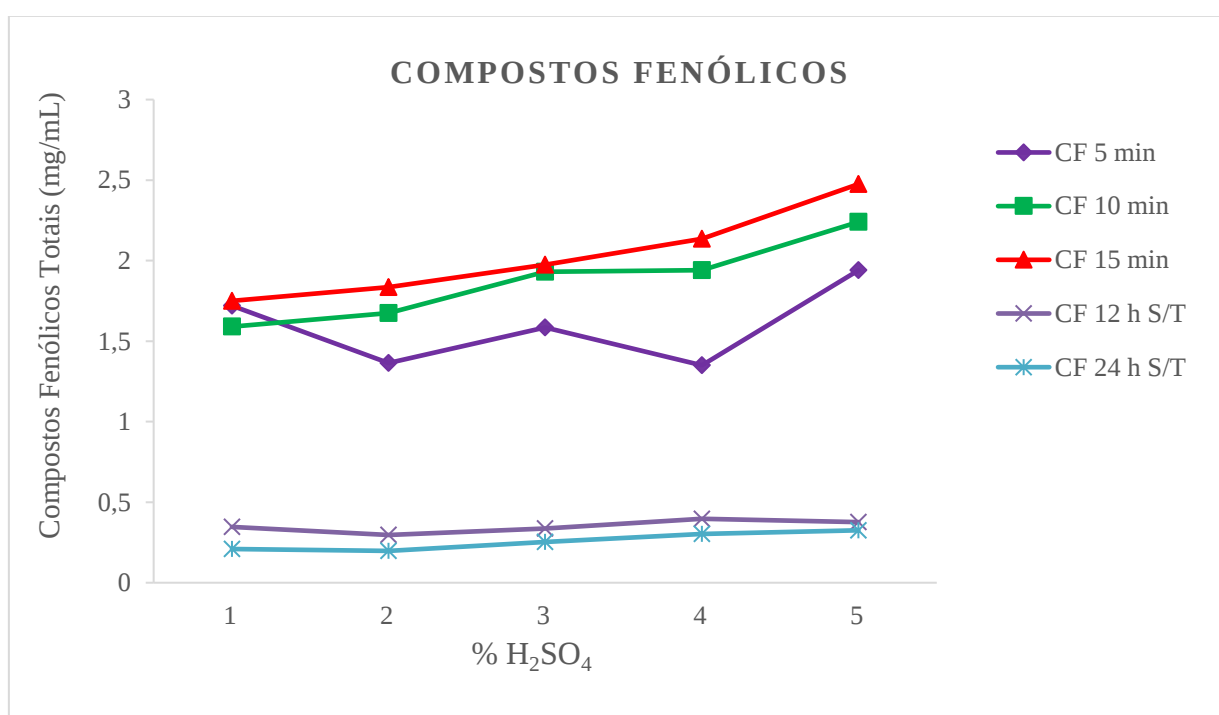
Fonte: elaborado pelo autor.

A quantidade de compostos fenólicos liberados no processo de hidrólise está representada na Figura 15, observa-se que, conforme aumenta a concentração de ácido sulfúrico a quantidade de compostos fenólicos liberados também aumenta gradativamente. O tempo de aquecimento também se destaca e influencia diretamente na liberação de compostos que podem inibir o processo fermentativo. A maior produção de compostos fenólicos ocorreu nas concentrações de 5% (v/v), contudo a concentração escolhida 2% (v/v) para a padronização do processo de hidrólise apresentou liberação de compostos fenólicos inferior as maiores concentrações de ácido sulfúrico reforçando que a da aplicação de baixas concentrações de ácido para realização da hidrólise pode tornar mais viável e econômico este processo.

Trinca et al. (2017) utilizando casca de soja obteve melhores resultados na concentração de 3,5 % (v/v) de ácido sulfúrico, contudo optou pela padronização de 1,5% (v/v) por não

apresentar diferença significativa entre os valores obtidos, utilizando o resultado de 34,4 mg/mL (AR) e 64,7 mg/mL (AT) valores esses, abaixo do obtido para casca de arroz. Apesar dos resíduos serem diferentes é importante fazer esta comparação, pelo fato de que, os valores obtidos em nosso trabalho foram em baixas concentrações de ácido sulfúrico.

Figura 15. Quantidade de compostos fenólicos liberados durante o processo hidrólise ácida com e sem uso de temperatura elevada (121°C e 1 kgf/cm²) nos tempos de aquecimento de 5, 10 e 15 minutos; 12 e 24 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Em seu estudo Hickert et al. (2013) ressaltam que a concentração de lignina presente na biomassa pode promover a liberação de elevada quantidade de compostos fenólicos durante o tratamento de hidrólise ácida, esses compostos por sua vez inibem o processo de fermentação. Demonstraram a relação da temperatura e da concentração de ácido na liberação de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, além de outros compostos que possam estar presentes após o pré-tratamento da casca de arroz. Esses compostos derivam da desidratação de pentoses e hexoses; o autor ainda ressalta a queda da quantidade de xilose e glicose pela presença dos compostos fenólicos (HICKERT, 2013).

Segundo Grossi (2015) a hidrólise com H₂SO₄ na concentração de 5% (v/v) durante 180 minutos na temperatura de 120°C, mostrou baixa produção de compostos tóxicos para fermentação como furfural 0,6% originado da concentração total de glicose produzida no

processo. Toda via, o autor enfatiza que o elevado tempo de reação (180 min), bem como, a alta concentração de ácido podem tornar a aplicação deste processo inviável economicamente e, em nossa pesquisa, estes parâmetros foram muito menores.

De Lima et al. (2015) aplicaram hidrólise com ácido sulfúrico (v/v) durante diferentes tempos e temperaturas em biomassa de bagaço de pedúnculos de caju e constataram que 6% de ácido na temperatura de 200°C durante 60 minutos apresentou melhores resultados para extração de glicose, obtendo 6406,2 mg/L, esse valor foi muito superior quando comparado com diferentes concentrações (2%, 4%) e diferentes temperaturas (160°C, 180°C) de 1053 (mg/L) e 2373,3 (mg/L), respectivamente, também testadas por eles. Isto se deve a maior quantidade de ácido e maior temperatura empregados. Entretanto, as condições utilizadas foram muito agressivas podendo promover a corrosão dos equipamentos e altos custos energéticos.

A utilização de concentração de 5% (v/v) de ácido sulfúrico em diferentes tempos 15 e 30 minutos em cascas de banana, o resíduo sólido gerado pela hidrólise ácida foi utilizado para o processo de hidrólise enzimática por Ferreira et al. (2018). Os autores constataram que o tempo do pré-tratamento ácido apresentou pouca diferença em relação ao tempo de utilização em autoclave (121°C e 1 kgf/cm²). Relatam que altas temperaturas podem influenciar na degradação das hexoses e pentoses, levando a formação de fufural e HMF, optando assim pela padronização de 15 minutos de aquecimento. No mesmo estudo foi realizada a comparação do pré-tratamento ácido com o tratamento enzimático, constatando o acréscimo de 55% de conversão de açúcares no enzimático em comparação ao ácido. Após o processo de desintoxicação, os autores constataram a redução de 80% na quantidade de compostos fenólicos quando comparado ao hidrolisado sem este processo, a remoção destes compostos é muito importante para melhorar o rendimento do processo fermentativo (FERREIRA et al., 2018). Isto também foi constatado nesta pesquisa nos hidrolisados sem tratamento enzimático.

5.2 Desintoxicação do hidrolisado.

A desintoxicação do hidrolisado tem se tornado um processo necessário para reduzir a quantidade de compostos tóxicos que são formados durante a aplicação do binômio hidrólise ácida e aquecimento. Esses compostos por sua vez podem inibir o crescimento dos micro-organismos e, conseqüentemente, reduzir a produção de etanol durante o processo de fermentação. Com isto em vista foram realizadas análises de compostos fenólicos, açúcares redutores e açúcares totais do hidrolisado que foi padronizado (H) e comparado com o mesmo

após o processo de desintoxicação (D). A Tabela 5 mostra os valores comparados estatisticamente entre eles.

Os resultados após o processo de desintoxicação mostraram que houve redução da quantidade de compostos fenólicos presentes no hidrolisado, isto é importante em vista que, tais compostos inibem a fermentação e diminuem o rendimento da produção de etanol. Contudo, é possível notar na mesma Tabela 5, que o desintoxicado (D) também apresentou redução na quantidade de açúcares redutores e totais, o que pode ser indesejado por reduzir a produtividade do mesmo.

Tabela 5. Análises de açúcares redutores, açúcares totais e compostos fenólicos, comparando o hidrolisado antes e após o processo de desintoxicação.

Variáveis	Açúcares Redutores (mg/mL)	Açúcares Totais (mg/mL)	Compostos Fenólicos (mg/mL)
Hidrolisado (HD)	33,00 $\pm$ 0,20 ^a	47,20 $\pm$ 0,25 ^a	1,67 $\pm$ 0,005 ^a
Desintoxicado (D)	30,36 $\pm$ 0,007 ^b	45,07 $\pm$ 0,016 ^b	1,58 $\pm$ 0,00 ^b
P - Valor	0,001	0,001	0,012

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($P < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor.

Em pesquisa, Silva et al (2020) utilizaram concentrações de 2,5%, 5%, 7,5% e 10% (v/v) de ácido H₂SO₄ durante 15 e 30 minutos de aquecimento (121°C e 1 kgf/cm²) em sabugo de milho, após realizar a hidrólise foi utilizado o processo de desintoxicação em todos os hidrolisados. A autora relata a eficácia do processo de desintoxicação com uso de carvão ativado, obtendo uma redução da quantidade de compostos fenólicos liberados de 0,97 mg/mL para 0,09 mg/mL, em seu hidrolisado padrão com 30 minutos de aquecimento e 2,5% de ácido sulfúrico. Contudo, também foi observada a redução da quantidade de açúcares totais e redutores, assim como no presente estudo. Portanto, é possível relacionar baixa concentração de ácido com elevadas temperaturas para redução da formação de compostos fenólicos no hidrolisado.

5.3 Fermentação

5.3.1 Fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A fermentação foi realizada em meio de cultura sintético. Os parâmetros utilizados foram temperatura de 30 °C; pH inicial de 6,5 e diferentes concentrações de glicose: 1%, 2%, 3%, 4% e 5% (m/v). Foram retiradas alíquotas nos tempos 4, 6, 8, 10, 12 e 14 horas. Após determinação dos melhores parâmetros foram realizadas fermentações utilizando meio sintético, hidrolisado e hidrolisado desintoxicado, durante o período de 24 horas.

Os resultados obtidos utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação do meio sintético em diferentes velocidades de agitação, pH, concentração de substrato se encontram na Tabela 6. Nesta também pode-se observar a produção de biomassa, a produção de etanol e a produtividade.

Tabela 6. Determinação dos parâmetros pH, biomassa, etanol e produtividade durante a fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético.

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	pH	Substrato (%)	Biomassa (g)	Etanol (mg/mL)	Produtividade (g/L.h)
1	14	30	0	4,31	1	0,12	2,59	0,18
2	14	30	0	3,76	2	0,21	4,40	0,31
3	14	30	0	3,33	3	0,24	9,97	0,71
4	14	30	0	3,20	4	0,45	7,34	0,52
5	14	30	0	2,93	5	0,75	17,11	1,22
6	14	30	50	4,07	1	0,17	1,16	0,08
7	14	30	50	3,55	2	0,25	1,21	0,08
8	14	30	50	3,25	3	0,34	3,10	0,22
9	14	30	50	3,01	4	0,39	4,14	0,29
10	14	30	50	2,93	5	0,57	10,05	0,71
11	14	30	100	3,92	1	0,12	0,14	0,01
12	14	30	100	3,36	2	0,22	0,15	0,01
13	14	30	100	3,19	3	0,27	3,15	0,22
14	14	30	100	2,96	4	0,32	6,13	0,44
15	14	30	100	3,18	5	0,37	7,05	0,50

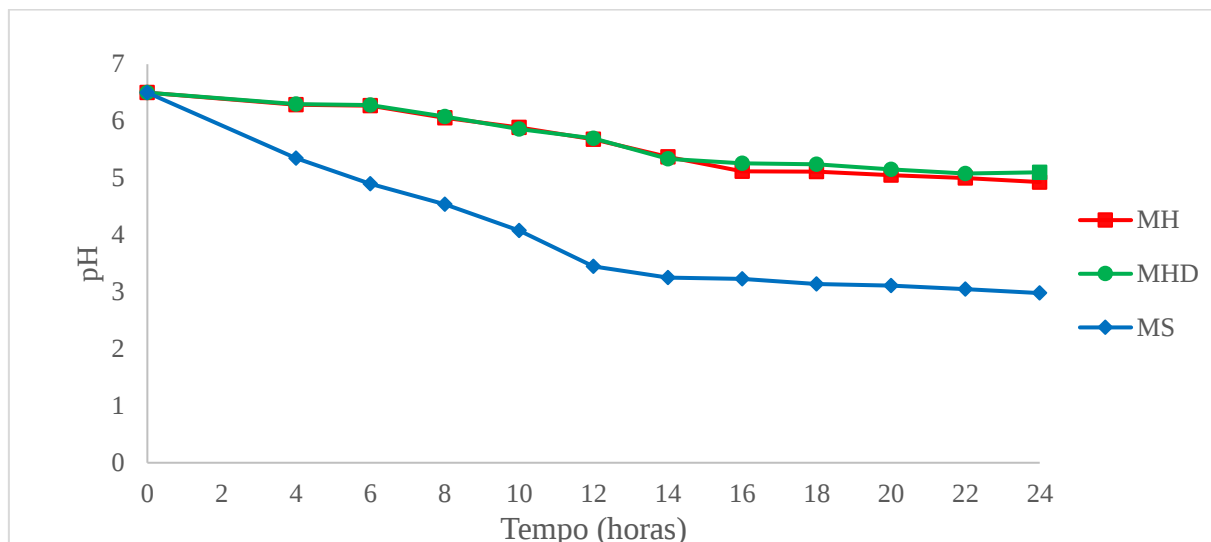
Fonte: elaborado pelo autor.

Com base nos resultados da Tabela 6 é possível considerar o ensaio 5 com a maior produção de etanol de 17,11 mg/mL, o maior crescimento celular de 0,75 g e a maior produtividade de 1,22 g/L.h. Estes valores foram obtidos utilizando 5% de substrato (glicose), temperatura de 30 °C, sem agitação (estático), no período de 14 horas. No geral, todos os ensaios apresentaram os melhores resultados, crescimento celular, etanol e produtividade, no período de 14 horas de fermentação.

5.3.1.1 Alteração de pH no meio de fermentação

Os meios sintéticos (MS), hidrolisado de casca de arroz (MH) e hidrolisado desintoxicado (MHD), foram utilizados durante o processo fermentativo em pH inicial de 6,5. A Figura 16 mostra o desempenho durante da fermentação alcoólica no período de 24 horas em relação ao pH. Nesta é possível constatar que ocorreu uma redução de forma acentuada durante as primeiras 12 horas, seguido de uma redução menor até o final do processo fermentativo. Os valores finais de pH após fermentação foram de 4,9 para meio hidrolisado, 5,1 para o desintoxicado e 2,9 para meio sintético. Ainda é possível observar uma pequena diferença de pH entre os hidrolisados e maior no meio sintético. Os autores Silva et al (2020) identificaram comportamento similar com a *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo de fermentação de sabugo de milho nas primeiras 14 horas de fermentação. A relação da levedura nos meios fermentativos manteve uma redução constante de pH durante as 8 primeiras horas para meio sintético, vários fatores podem estar relacionados a essa redução de pH, como crescimento da levedura, consumo do substrato presente no meio e formação de produtos variados e produção de etanol.

Figura 16. Cinética do pH, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por *Saccharomyces cerevisiae* em um período de 24 horas.



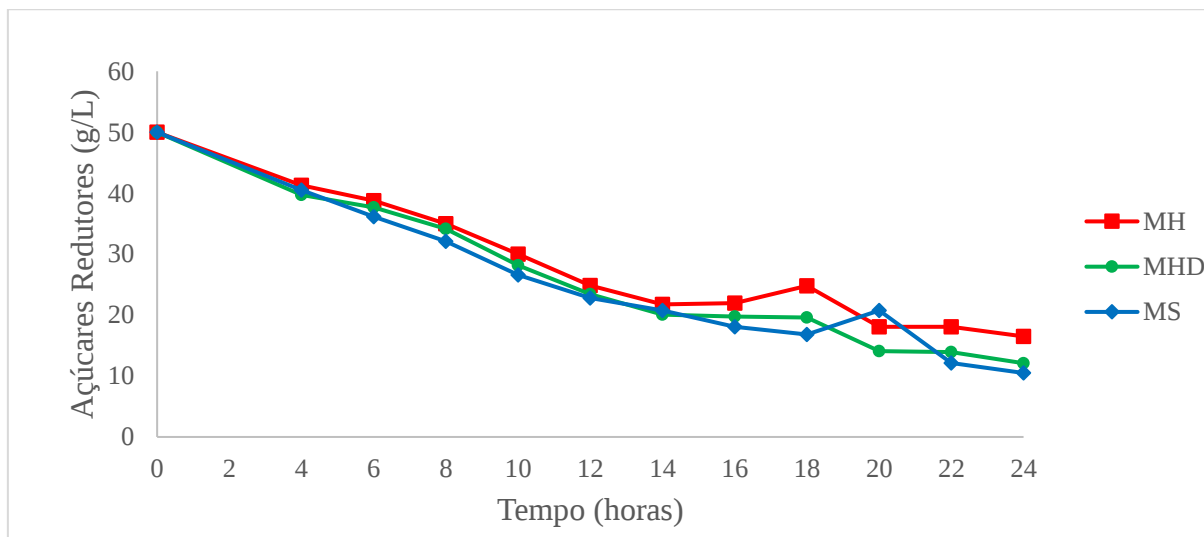
Fonte: elaborado pelo autor.

No processo fermentativo o pH influencia diretamente o rendimento do mesmo, uma vez que, essas alterações podem afetar o metabolismo do micro-organismo. Portanto, o pH pode exercer papel importante na inibição fermentativa, e consequentemente levar à alteração do metabolismo celular. Durante a produção de etanol o pH do meio tende a diminuir pelo consumo de substratos e formação de subprodutos que promovem sua diminuição de uma forma gradativa durante esse processo (YOSHIKAWA, 2015).

5.3.1.2 Consumo de açúcares redutores durante a fermentação

A Figura 17 mostra os açúcares redutores que foram consumidos pela levedura para crescer e produzir etanol durante 24 horas do processo. A concentração inicial foi 50 g/L para todos os meios. No meio sintético houve maior consumo de açúcares restando apenas 10,5 g/L, para o hidrolisado 16,5 g/L e para desintoxicado e 12,1 g/L.

Figura 17. Consumo de açúcares presentes, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por *Saccharomyces cerevisiae* em um período de 24 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

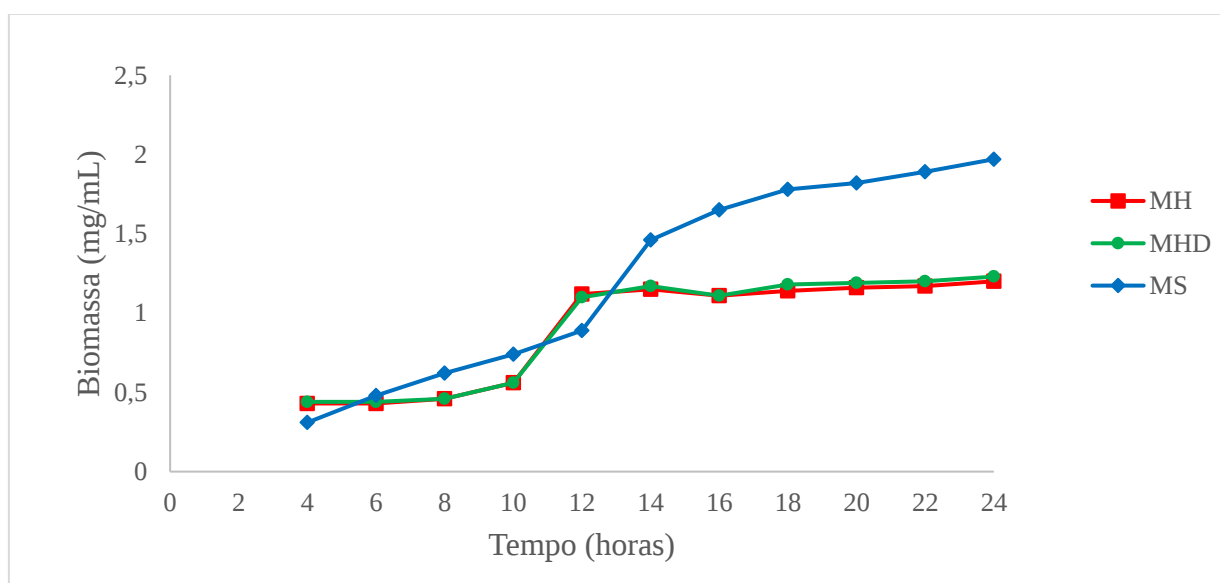
Em seu estudo Boboescu et al. (2017) utilizaram a *Saccharomyces cerevisiae* visando produzir etanol de segunda geração utilizando hidrolisados de hemicelulose, obtendo uma produção de 25 g/L de etanol com uma concentração inicial de 50 g/L de açúcares. Os autores ressaltam a eficácia da estratégia utilizada nesse processo, pela presença de glicose e xilose e pelo consumo de ambas durante o processo no tempo de 48 horas. O consumo se deu nas primeiras 24 horas, tornando-se estável após este período. A produção de etanol se tornou estável após o mesmo período. O consumo dos açúcares presentes na fermentação se mostrou similar ao do presente estudo para os meios sintético e hidrolisado desintoxicado, obtendo valores de 10 e 12,1 g/L respectivamente após 24 horas de fermentação.

5.3.1.3 Crescimento Celular (produção de Biomassa) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* foi inoculada nos meios de fermentação para avaliar o crescimento celular. A Figura 18 mostra os resultados obtidos nas fermentações durante o tempo de 24 horas. Esta Figura 18 mostra que com decorrer do tempo durante o processo fermentativo a biomassa teve um aumento nos 3 meios utilizados (MH, MHD e MS). Tornasse possível notar que o meio sintético (MS) mostra uma maior produção de biomassa se comparado com os hidrolisados e apresenta um acréscimo após o período de 12 horas, chegando

a produzir 1,97 mg/mL ao final do processo de 24 horas. Os comportamentos do crescimento nos meios hidrolisado e desintoxicado se mostraram muito similares na produção de biomassa durante o processo de fermentação, com uma maior produção em 10 horas e uma produção maior no final (1,2 mg/mL e 1,27 mg/mL, respectivamente).

Figura 18. Cinética do crescimento celular (biomassa), determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por *Saccharomyces cerevisiae* em um período de 24 horas.



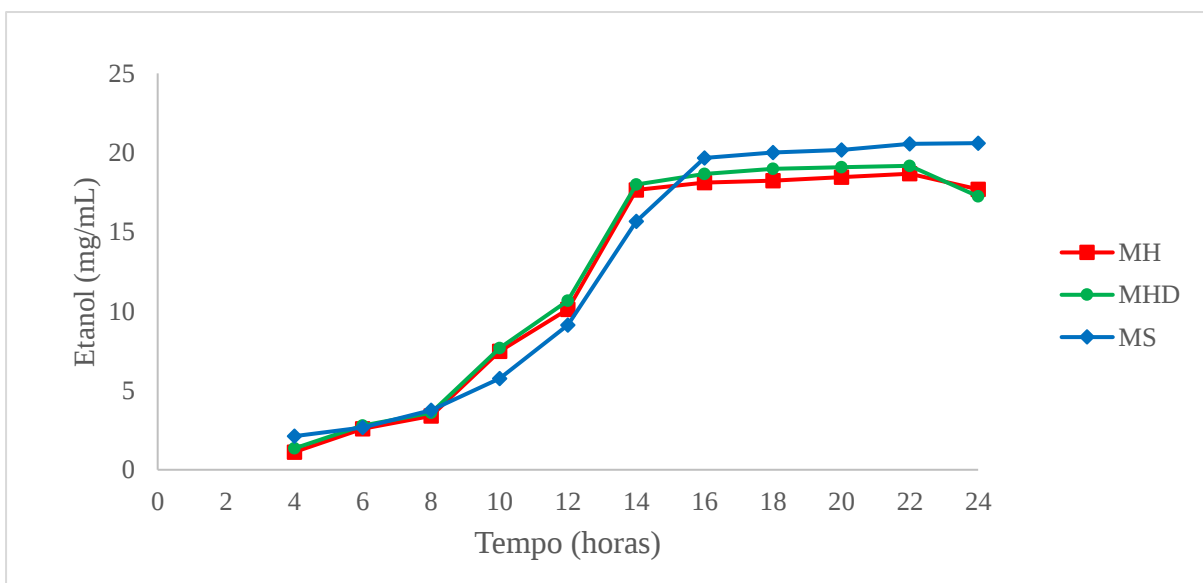
Fonte: elaborado pelo autor.

Em estudo sobre métodos de separação por diferença de fases no crescimento celular da *Saccharomyces cerevisiae*, Lainioti et al. (2010) utilizaram dois tempos de fermentação de 80 e 35 horas. Os autores constataram uma maior produção de biomassa nas 15 primeiras horas, onde foram utilizados pH inicial de 2 e 5, com várias de temperatura entre 30 °C, 25 °C, 20 °C e 15 °C. Os ensaios com pH inicial 5 e temperaturas de 25 e 30 °C apresentaram maior produção de biomassa nas 10 primeiras horas, seguindo em uma redução posteriormente, outros parâmetros mostraram um baixo crescimento celular e de forma constante. Tais parâmetros novamente são reforçados neste trabalho, ao realizar uma fermentação de 24 horas com uma concentração inicial de 100 g/L de açúcares redutores, que ao final da fermentação foram todos consumidos, obtendo uma produção de 50 g/L de etanol, com produção em constante crescimento até o término da fermentação e dos açúcares presentes.

5.3.1.4 Produção de bioetanol de segunda geração

Figura 19 apresenta os resultados da produção de etanol durante a fermentação de 24 horas, em intervalos de 2 horas, e a primeira dete rminação a partir da 4 hora de fermentação. Os melhores resultados obtidos para produção de etanol foram de 20,6 mg/mL para meio sintético em 24 horas, 18,67 mg/mL para o meio hidrolisado em 22 horas e 19,17 mg/mL para o desintoxicado em 22 horas. O meio sintético apresentou produção estável até o período de 24 horas enquanto o MH e MHD apresentaram uma diminuição após o período de 22 horas.

Figura 19. Cinética da produção de etanol, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por *Saccharomyces cerevisiae* em um período de 24 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

À medida que o crescimento celular aumentou (Figura 18) a produção de etanol também apresentou um acréscimo (Figura 19), principalmente após o período de 12 horas de fermentação. Como observado no período de 4 a 10 horas de fermentação, o crescimento celular ainda é baixo, o que corrobora com a baixa produção de etanol.

Mulko et al. (2016) estudaram a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizados em matrizes de hidrogel. Foi utilizado 3% de glicose como substrato, durante o período de 60 horas de fermentação. Obtendo melhores resultados para a produção de etanol de 125 mg/L, ressaltando a melhoria no rendimento do processo, redução da mutação dos genes da levedura, além de diminuir as chances de contaminação durante a fermentação pois a levedura se encontra imobilizada nas esferas de hidrogéis. Os autores ainda ressaltam a

importância para o processo pela redução de etapas e energia gasta para a remoção da levedura após o processo fermentativo se pensado em aplicação a nível industrial.

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas com alginato de sódio, utilizando um reator de leito concentrado, durante fermentações de 11 ciclos de bateladas foram realizadas por Mishra et al. (2016). Os autores avaliaram o consumo deste substrato (glicose), o comportamento da temperatura de 30 °C, 35 °C e 40 °C em relação a produção de etanol nesses meios, obtendo produção de 90 g/L ao término das bateladas e consumo de todo os substratos no mesmo período. Os mesmos ressaltam a eficiência para produção de etanol na temperatura de 30 °C, que se mostrou melhores resultados em relação às outras temperaturas, ressaltando que a temperatura de 40 °C que teve pouco consumo de glicose e uma produção de etanol de menos de 10 g/L. Foi possível também identificar que a imobilização se mostrou eficaz durante a fermentação em diferentes concentrações de substrato. A eficiência da utilização de *S. cerevisiae* imobilizada foi identificada no presente estudo, produzindo 20,6 mg/mL de etanol durante a fermentação de 24 horas.

A utilização de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em grânulos de resina foto-reticuláveis para produção de etanol a partir de palha de arroz foi estudado por Watanabe et al. (2012), no qual foi estudado o processo de fermentação durante 72 horas utilizando concentração inicial de 40 g/L de substrato. O consumo de açúcares se deu em grande quantidade nas primeiras 12 horas chegando a valores a 5 g/L após esse período, a produção de etanol se deu nas primeiras 24 horas, após esse período a produção se estabilizou até o final do processo. Foi possível ainda observar a eficiência das células imobilizadas pela produção de 38 g/L em 72 horas, células livre da levedura produziram 30 g/L de etanol para o mesmo período. Em comparação no período de 24 horas os valores para produtividade de etanol se mostraram superior, obtendo a produção de 35 g/L para células da levedura imobilizadas e 30 g/L para livres, para o presente estudo o etanol obtido foi de 19,17 g/L para a casca de arroz utilizando *S. cerevisiae* imobilizada em alginato de sódio. A diferença pode ser observada pela utilização da hidrólise enzimática em comparação com hidrólise ácida deste estudo.

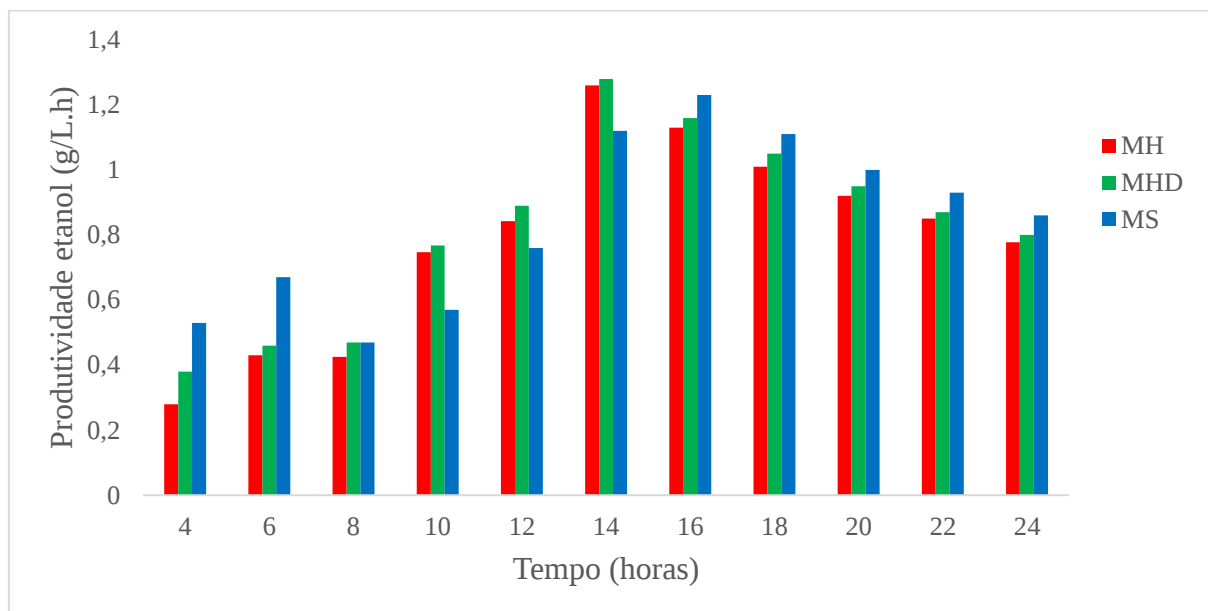
5.3.1.5 Produtividade

A produtividade de etanol para os meios utilizados nesse estudo está apresentada na Figura 20, nela se torna possível constatar que a maior resposta para produtividade foi de 1,28 g/L.h para o meio desintoxicado em 14 horas, seguido o meio hidrolisado apresentou 1,26 g/L.h em 14 horas e 1,23 g/L.h para o meio sintético em 16 horas. Tal comportamento foi reflexo da

produção de etanol nos meios hidrolisados e desintoxicado, que apresentaram uma maior produção até o período de 14 horas de fermentação, seguido de uma estabilidade na produção. O meio sintético por sua vez apresentou menor produção de etanol nas primeiras 16 horas de fermentação, contudo, após esse período se mostrou mais eficiente para a produção seguindo de um aumento constante até o término da análise em 24 horas.

Conforme a fermentação se sucedeu o rendimento diminui após 14 horas (MH, MHD) e em 16 horas (MS) isso pode ter ocorrido pelo consumo do substrato para o crescimento, além da formação de outros subprodutos durante o processo.

Figura 20. Produtividade do etanol, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por *Saccharomyces cerevisiae* em um período de 24 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os pesquisadores Sakomoto et al. (2012) utilizaram diferentes combinações da levedura em 5 g/L de substrato inicial na fermentação para produção de etanol a partir de casca de arroz, após 72 horas de fermentação obteve uma quantidade de 24,4 g/L de etanol consumindo 93% dos açúcares presentes no meio apresentando assim uma produtividade de 0,56 g/L/h para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O processo de desintoxicação foi realizado após a liberação dos açúcares, e foi observado que os compostos presentes no material lignocelulósico influenciaram o rendimento da obtenção de etanol. Representando valores de produtividades inferiores aos obtidos no presente estudo.

5.3.2 Fermentação com a levedura *Pachysolen tannophilus*

A fermentação foi realizada em meio de cultura sintético. Os parâmetros utilizados foram temperatura de 30 °C; pH inicial de 6,5; diferentes concentrações de substratos 1%, 2%, 3%, 4% e 5% (m/v). Foram retiradas alíquotas nos tempos 4, 6, 8, 10, 12 e 14 horas. Após determinação dos melhores parâmetros foram realizadas fermentações com os meios sintético, hidrolisado e hidrolisado desintoxicado, durante o período de 24 horas.

Os resultados obtidos utilizando a levedura *Pachysolen tannophilus* durante a fermentação do meio sintético em diferentes velocidades de agitação, pH, concentração de substrato se encontram na Tabela 7. Nesta também pode-se observar a produção de biomassa; a produção de etanol e a produtividade.

Tabela 7. Determinação dos parâmetros pH, biomassa, etanol e produtividade durante a fermentação de *Pachysolen tannophilus* em meio sintético.

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	pH	Substrato (%)	Biomassa (mg/mL)	Etanol (mg/mL)	Produtividade (g/L.h)
1	14	30	0	4,50	1	0,09	0,711	0,05
2	14	30	0	4,40	2	0,15	0,515	0,03
3	14	30	0	4,39	3	0,13	1,47	0,10
4	14	30	0	4,35	4	0,09	1,59	0,11
5	14	30	0	4,30	5	0,29	3,60	0,25
6	14	30	50	5,23	1	0,07	0,940	0,06
7	14	30	50	5,19	2	1,52	0,557	0,04
8	14	30	50	5,13	3	1,55	0,311	0,02
9	14	30	50	5,10	4	0,09	1,56	0,11
10	14	30	50	5,09	5	0,09	1,67	0,12
11	14	30	100	5,36	1	0,07	0,339	0,02
12	14	30	100	5,42	2	0,07	1,32	0,09
13	14	30	100	5,37	3	0,07	0,152	0,01
14	14	30	100	5,37	4	0,07	1,268	0,09
15	14	30	100	5,35	5	0,07	1,083	0,08

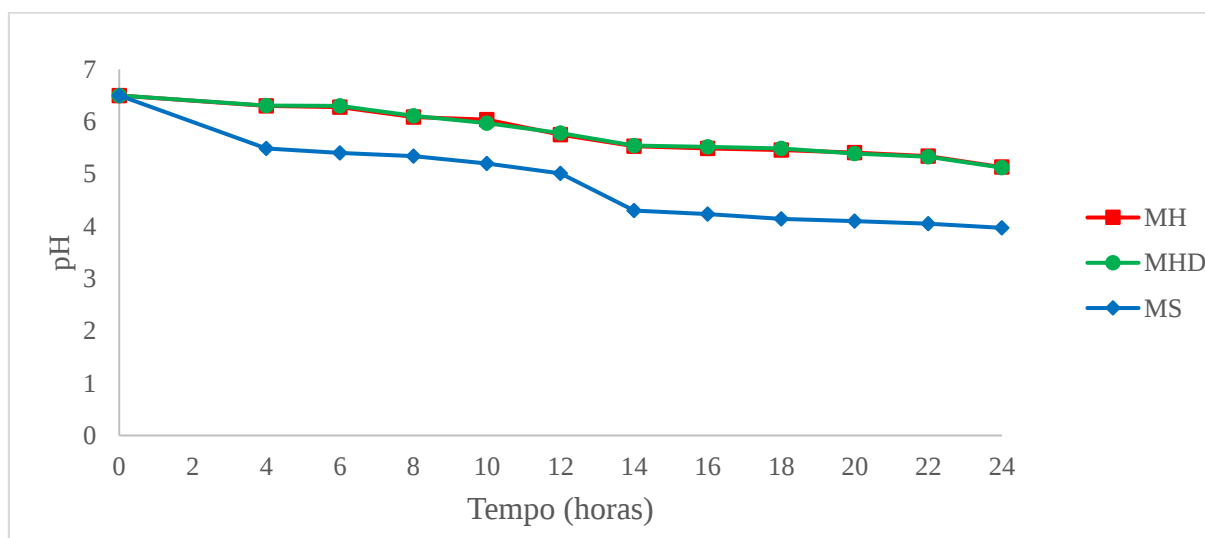
Fonte: elaborado pelo autor.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 7, é possível considerar o ensaio 5 com a maior produção de etanol de 3,60 mg/mL, crescimento celular de 0,29 g e produtividade de 0,25 g/L.h. Estes valores foram obtidos utilizando 5% de substrato (glicose), temperatura de 30 °C, sem agitação (estático), no período de 14 horas. Todos os ensaios apresentaram baixo crescimento celular, baixa produção de etanol e baixa produtividade no período de 14 horas de fermentação. Portanto, existe a necessidade de um tempo maior de fermentação para que a levedura se adapte ao meio e possa crescer para produzir etanol com maior eficiência.

5.3.2.1 Alteração de pH no meio de fermentação

Os meios utilizados para a fermentação foram, meio sintético contendo glicose, hidrolisado de casca de arroz e hidrolisado desintoxicado e todos tiveram pH inicial de 6,5. Este valor de pH foi igual ao utilizado para os meios usados na fermentação da *Saccharomyces cerevisiae*. A Figura 21 mostra os resultados obtidos em relação ao pH durante o processo de fermentação de 24 horas para produção de etanol pela levedura *Pachysolen tannophilus*. Os valores de pH dos meios hidrolisado e hidrolisado desintoxicado mostraram valores muito similares durante a fermentação (5,13 e 5,12 respectivamente) apresentando pequena redução, mas os valores foram superiores ao valor de pH do meio sintético (3,97).

Figura 21. Cinética do pH, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por *Pachysolen tannophilus* em um período de 24 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

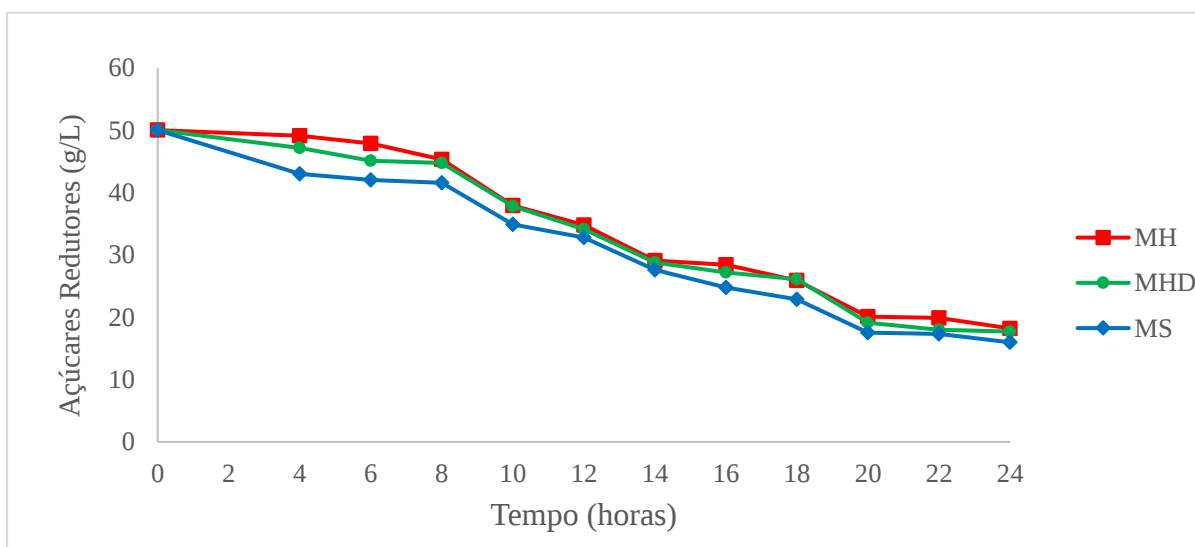
No estudo realizado por Da Silva (2014) foi analisado o comportamento da *P. tannophilus* em meio sintético de glicose e em meio hidrolisado e meio hidrolisado desintoxicado de bagaço de cana de açúcar durante 24 horas de fermentação. O comportamento do pH foi similar ao apresentado neste estudo. Para ambos os trabalhos o pH do meio sintético mostrou uma redução mais acentuada se comparado com os meios hidrolisados, mesmo sendo de resíduos diferentes apresentaram resultados similares.

5.3.2.2 Consumo de açúcares redutores durante a fermentação

A concentração inicial dos açúcares para todos nos meios utilizados pela levedura *Pachyson tannophilus* durante o processo de fermentação foi de por 50 g/L. A Figura 22 mostra as 24 horas do processo, nesta observa-se que os do meio sintético forma os mais consumidos e restaram 15,97 g/L, já para o meio hidrolisado restaram 18,2 g/L e 17,7 g/L para o meio hidrolisado desintoxicado.

O consumo teve maior eficiência após o período de 8 horas de fermentação, para todos os meios estudados. Após esse período, a levedura se adaptou ao meio e obteve um crescimento celular maior, favorecendo um maior consumo dos açúcares presente até o término do processo fermentação de 24 horas.

Figura 22. Consumo de açúcares, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por *Pachysolen tannophilus* em um período de 24 horas.



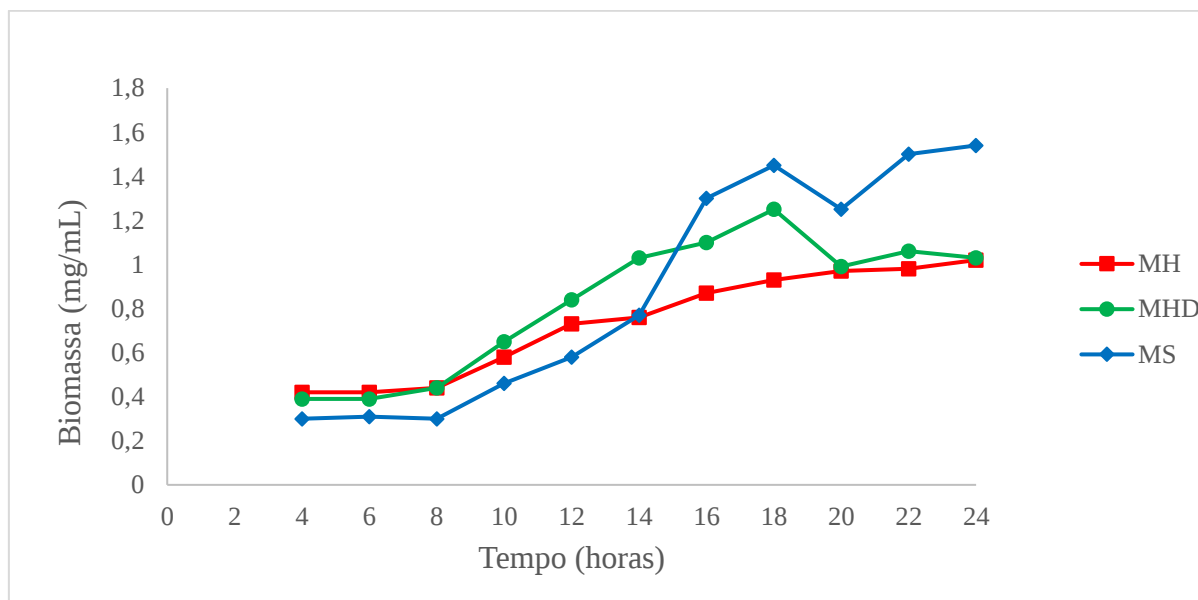
Fonte: elaborado pelo autor.

Liu et al. (2012) utilizaram glicerol para produção de etanol pela *Pachysolen tannophilus* durante o período de 90 horas de fermentação com uma concentração inicial de 25 g/L. A produção de etanol foi de 6 g/L ao término do processo avaliado, no mesmo período todo o glicerol do meio foi consumido pela levedura. No período de 25 horas similar ao do presente estudo, o consumo do glicerol foi baixo chegando a uma concentração de 20 g/L no meio e uma produção de 2 g/L de etanol para o mesmo horário. A resposta para consumo de açúcares pela fermentação se mostrou similar ao obtido nesse estudo, com uma concentração de 19,97 g/L para o meio sintético 18,2 g/L para o hidrolisado e 17,7 g/L no meio sintético desintoxicado, quando comparado ao mesmo período de fermentação de 24 horas.

5.3.2.3 Crescimento celular (produção de Biomassa) da levedura *Pachysolen tannophilus*

Foi avaliado o crescimento da levedura *P. tannophilus* imobilizada em alginato de sódio durante 24h de fermentação e os resultados estão apresentados na Figura 23. Nesta pode ser observado que as 4 primeiras horas não foram avaliadas por serem o período de adaptação e crescimento da levedura nos meios de cultura e pode-se observar o crescimento celular dos meios sintético, meio hidrolisado e meio hidrolisado desintoxicado (Figura 23). O crescimento se torna acentuado a partir de 8 horas para todos os meios, aparentemente foi o período necessário para a levedura se adaptar aos meios e conseguir crescer. O meio sintético se mostrou menos eficiente para a produção de biomassa durante as 14 primeiras horas de fermentação, se comparado com os outros dois meios do estudo (meio hidrolisado e meio hidrolisado desintoxicado de casca de arroz). O meio hidrolisado desintoxicado foi mais efetivo em relação ao hidrolisado até o período de 18 horas, a partir disso ocorreu uma queda em que ambos apresentaram resultados similares ao final das 24 horas, de 1,02 g/L e 10,3 g/L, respectivamente, o meio sintético teve uma produção de biomassa de 1,54 g/L para o mesmo período.

Figura 23. Cinética do crescimento celular (biomassa), determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por *Pachysolen tannophilus* em um período de 24 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Em seu estudo El Harchi et al. (2018) avaliou comportamento da *Pachysolen tannophilus* durante o período de 4 dias de fermentação utilizando *Ulva rígida* como matéria prima. Na determinação de sua capacidade de crescimento celular foram utilizados 35 g/L de substrato inicial (açúcares presentes na matéria prima), e obtiveram valores de 3,8 g/L de biomassa no término do período de 24 horas. Os autores constataram o crescimento celular da levedura apenas no primeiro dia de fermentação e um decréscimo nos dias subsequentes. Esses valores são superiores aos encontrados no presente trabalho, pois o meio sintético, que promoveu a melhor resposta em comparação aos do estudo mencionado, obteve uma biomassa com 1,54 g/L, ou seja, menos da metade se comparado com esses autores. Contudo, a produção de etanol se mostrou muito similar com uma produção de 11,92 g/L ao término do primeiro dia de fermentação. Estes mesmos autores também constataram que após esse período a produção de etanol foi sofrendo um decréscimo ao chegar no 4 dia de fermentação.

Trabalho realizado por Romero et al. (2007) estudando o crescimento da *P. tannophilus* no decorrer de 24 horas, utilizando hidrolisados ácidos de resíduos de oliveiras (galhos/podas) constataram um crescimento acentuado durante as 24 horas no meio hidrolisado com ácido sulfúrico 4 N, em comparação com a concentração de 1 N, chegando a obter valores de 1,62 g/L de crescimento celular e 0,750 g/L para o 1 N durante 20 horas. O aumento na concentração do ácido gerou uma maior liberação dos açúcares que podem ser fermentados pela levedura,

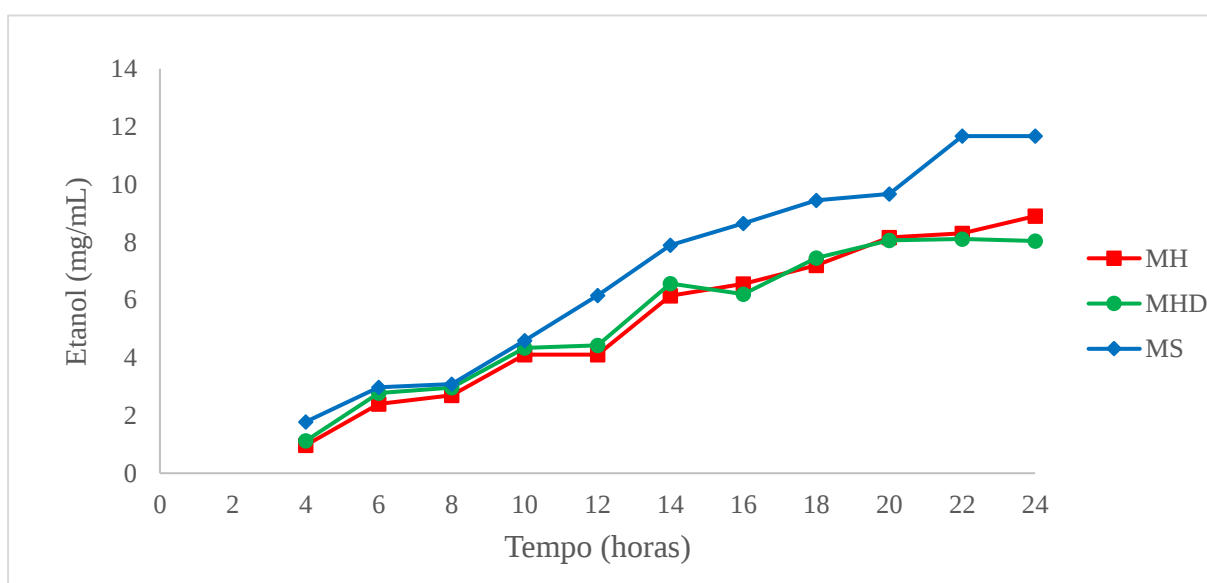
que consequentemente levou a um meio em que a *P. tannophilus* conseguiu se desenvolver de forma mais eficiente para produzir etanol. A resposta para crescimento celular se mostrou similar ao obtido nesse estudo para meio sintético com 1,54 g/L em 24 horas.

5.3.2.4 Produção de bioetanol de segunda geração

Os resultados obtidos durante a fermentação de 24 horas para produção de etanol pela levedura *Pachysolen tannophilus* estão mostrados pela Figura 24. As determinações foram realizadas em intervalos de 2 horas a partir da 4 hora de fermentação.

Os resultados alcançados na produção de etanol foram de 11,67 mg/mL para meio sintético em 22 horas se mantendo constante em 24 horas; 8,9 mg/mL para o meio hidrolisado em 24 horas e 8,11 mg/mL para o meio hidrolisado desintoxicado em 22 horas com uma pequena redução no período de 24 horas. A produção no meio sintético foi aumentando até o período de 24 horas, enquanto no MH e no MHD ocorreu uma diminuição após 22 horas.

Figura 24. Cinética da produção de etanol, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por *Pachysolen tannophilus* em um período de 24 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

A levedura *Pachysolen tannophilus* foi imobilizada em glicerol por Stepanov et al. (2017) para produção de etanol. Além disso, o estudo teve como objetivo avaliar o comportamento desta levedura durante o período de 20 horas e sua capacidade de produzir etanol por processo

fermentativo com uma concentração inicial de glicerol de 20 g/L. Durante o período máximo de estudo, o maior valor para a produção obtido durante 20 horas foi de 8,5 g/L de etanol, com uma produtividade de 0,47 g/L.h e crescimento celular de 3,0 g/L. O rendimento do processo foi 16% maior com o uso da levedura imobilizada confirmando assim a eficiência da imobilização de *P. tannophilus* para produção de etanol. Resultados similares para a produção de etanol a partir de casca de arroz com *P. tannophilus* imobilizada em alginato de sódio, nos quais, o meio hidrolisado apresentou 8,9 g/L e o hidrolisado desintoxicado 8,04 g/L, para o meio sintético os valores da produção de etanol foram superiores obtendo 11,67 g/L em 22 horas de fermentação.

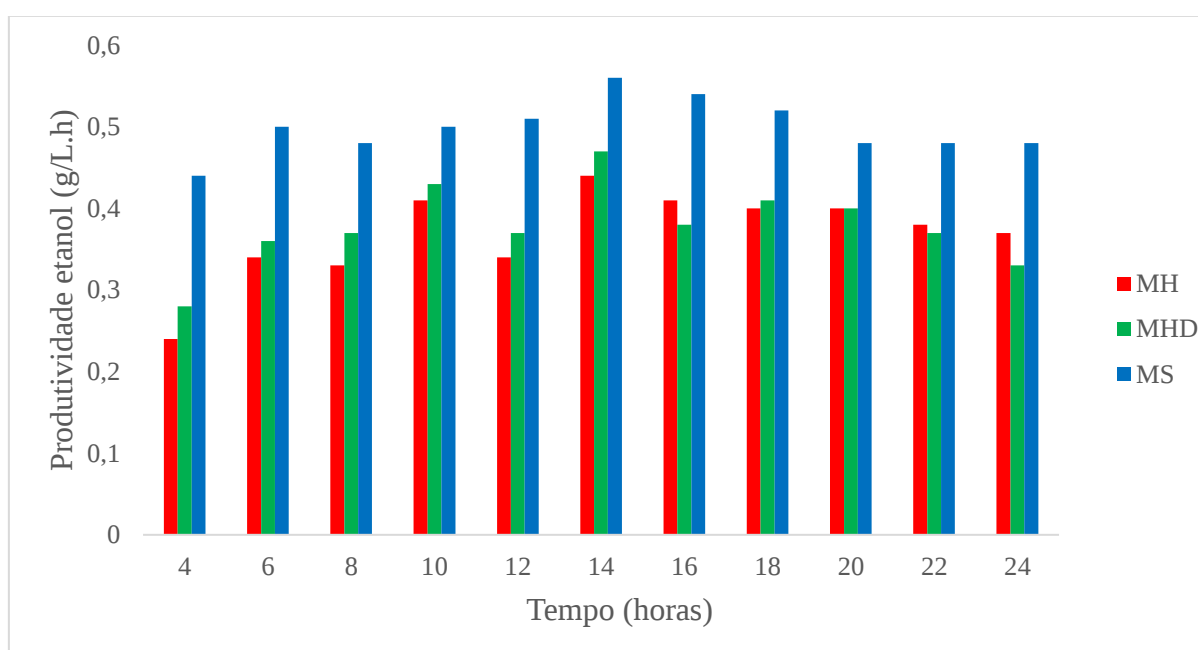
Zhao et al. (2008) estudaram a influência das concentrações de glicose e xilose (1:1) utilizando 20g/L de xilose para 20 g/L de glicose para a produção de etanol e biomassa pela *Pachysolen tannophilus* durante período de 60 horas. Para o meio contendo apenas glicose os resultados foram de 8 g/L para produção de etanol e 5.25 g/L de biomassa; foi possível observar uma diminuição constante na quantidade de glicose e na produção de biomassa após 12 horas de fermentação. Já nos meios que utilizaram apenas xilose como substrato tiveram uma produção de 2,93 g/L de etanol e 6,5 g/L de biomassa e foi observada uma queda na produção de etanol após 50 horas de fermentação, utilizando o meio de xilose a levedura obteve um maior crescimento celular, contudo isso não se refletiu na produção de etanol que foi inferior ao meio contendo glicose. Para o meio contendo glicose e xilose os autores obtiveram resultados de 4 g/L de etanol durante o período de 35 horas de fermentação, seguido de uma queda na produção após este período para o crescimento celular valores foram de 6,5 g/L ao término do período de fermentação. A produção de etanol se mostrou maior no presente estudo com 11,67 g/L em meio sintético, ressaltando a utilização da imobilização celular em alginato de sódio que melhorou a produtividade da *P. tannophilus* em comparação com os autores.

5.3.2.5 Produtividade

A produtividade de etanol pela levedura *Pachysolen tannophilus* foi menor se comparada a *Saccharomyces cerevisiae* e a maior produtividade foi no período de 14 horas para todos os meios durante a fermentação. Os resultados mostrados na Figura 25, torna possível observar que o meio sintético apresentou melhores rendimentos se comparada aos outros meios chegando a 0,56 g/L.h, já para os outros foram de 0,44 e 0,47 g/L.h para o meio hidrolisado e para o meio hidrolisado desintoxicado, respectivamente. Apesar disso, a produção de etanol por *P. tannophilus* continuou de forma crescente até o final do processo; neste período de 14 horas a

levedura se adaptou ao meio e cresceu de forma que sua produção de etanol fosse mais eficaz e em maior quantidade comparado ao período anterior. O meio hidrolisado apresentou menor produtividade em relação ao meio desintoxicado, contudo, ao período de 20 horas se estabilizou e posterior apresentou uma maior produtividade.

Figura 25. Produtividade do etanol, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD por *Pachysolen tannophilus* em um período de 24 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Estudo realizado por Karagoz et al. (2019) utilizando *P. tannophilus* imobilizada em criogel utilizando glicerol como substrato mostrou que a levedura foi capaz de produzir etanol. Estes autores relatam uma produção de etanol de 8,2 g/L e rendimento de 0,23 g/L.h. Além disso, mencionam que a técnica mostrou a eficiência da levedura imobilizada e que essa tecnologia elevou a produtividade e melhorou o controle durante o processo. Resultado do presente trabalho mostrou melhores valores para a produtividade de etanol, tal melhoria ocorreu pela eficiência exercida da levedura *P. tannophilus* imobilizada em alginato do sódio obtendo valores de 0,56 g/L.h em 14 horas de fermentação.

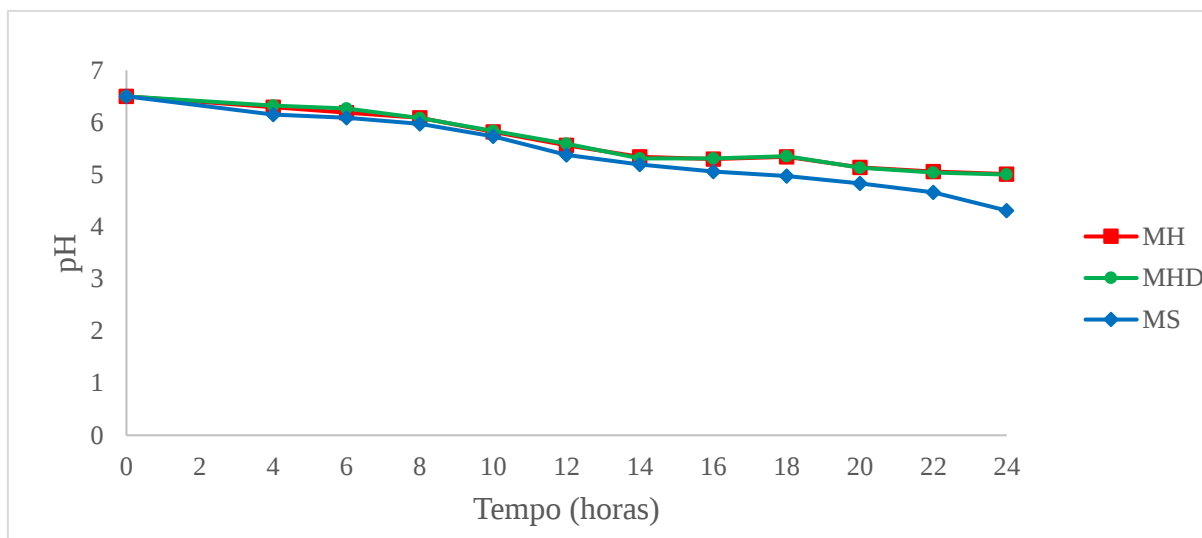
5.3.3 Fermentação pelo consorcio de micro-organismos

O consorcio das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* foi testado nas mesmas condições utilizadas durante as fermentações dos hidrolisados e meio sintético individualmente. Estas condições foram determinadas pelos melhores resultados nos ensaios individuais realizados anteriormente para ambos os micro-organismos. Foram utilizados: concentração de 5% de substrato com pH inicial de 6,5, 30 °C de temperatura e sem agitação (estática) para a fermentação. Inicialmente foi inoculada no meio de cultura a *Saccharomyces cerevisiae*, imobilizada em alginato de sódio, durante as primeiras 12 horas do processo fermentativo, posteriormente foi substituída nos meios por *Pachysolen tannophilus*, também imobilizada em alginato de sódio, durante as últimas 12 horas do processo. Foram analisados os parâmetros pH final, açúcares totais, produção de etanol e crescimento celular a partir de 4 horas de fermentação e após, com intervalos de 2 horas até o término de 24 horas.

5.3.3.1 Alteração de pH no meio de cultivo

O meio sintético apresentou maior queda no pH após 24 horas de fermentação (4,31) e os meios hidrolisado e hidrolisado desintoxicado tiveram pH de 5,01 e 5,0 respectivamente (Figura 26). A substituição das leveduras ocorreu após 12 horas, tendo isso em vista a queda de pH nesses processos ocorreu de forma mais linear, pois a levedura necessitou de tempo para se desenvolver e produzir etanol.

Figura 26. Cinética do pH, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD pelo consorcio de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* em um período de 24 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

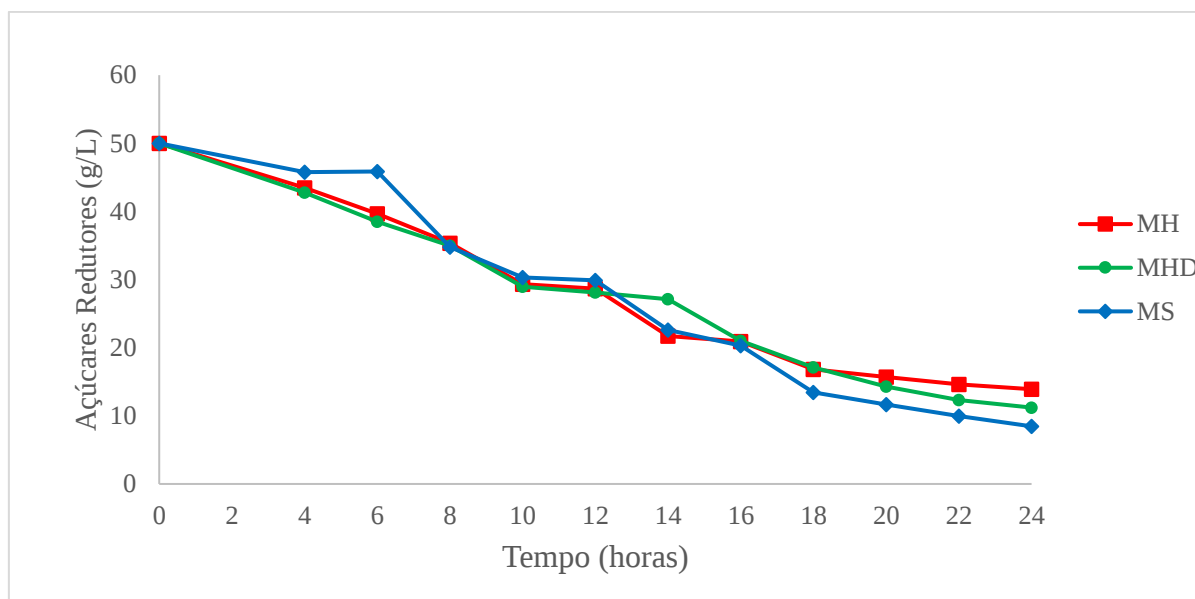
Produção de etanol por resíduos da cozinha (resíduos de alimentos), pela co- fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipits* foi estudada por Ntaikou et al. (2018). Eles utilizaram diferentes concentrações de substrato de 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, com diferentes concentrações de pH inicial 5, 5,4, 5,8 respectivamente durante o período de 50 horas de fermentação. Os meios apresentaram uma queda acentuada de pH durante as primeiras 10 horas de fermentação, chegando a valores de 2,5 para todos os meios em 20 horas de fermentação. Esse valor, por sua vez, se manteve estável até o final no período de 50 horas. Os autores ainda constatarem a eficiência do consorcio das duas leveduras e sua capacidade para consumir uma maior quantidade dos açúcares presentes no meio para produção de etanol, tal como a capacidade desses resíduos para a produção de bioetanol. Para o presente estudo a redução do pH se mostrou menor pela imobilização das leveduras *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* em alginato de sódio, chegando a valores de 5,01 para meio hidrolisado, 5 para hidrolisado desintoxicado e 4,31 para sintético. Devido as leveduras possuírem maior rendimento em pH mais altos, a fermentação ocorreu de forma mais eficiente obtendo uma maior produção de etanol para o presente estudo.

5.3.3.2 Consumo de açúcares Redutores durante a fermentação do consorcio de leveduras

A concentração inicial dos açúcares redutores foi de 50 g/L no hidrolisado e no hidrolisado desintoxicado e meio sintético utilizados pelo consorcio de leveduras para a produção de etanol por fermentação. A Figura 27 mostra as 24 horas do processo realizado,

nesta pode-se observar que os açúcares do meio sintético tiveram um consumo maior restando 8,46 g/L, e para o hidrolisado 13,91 e 11,21 g/L para o desintoxicado.

Figura 27. Consumo de açúcares, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD pelo consorcio de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* em um período de 24 horas.



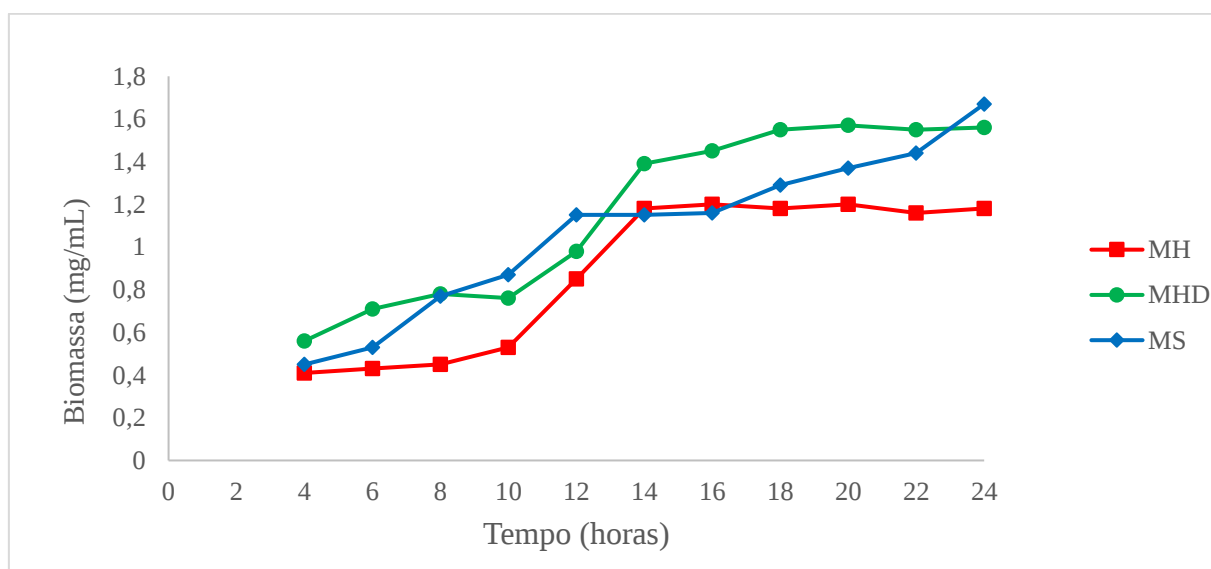
Fonte: elaborado pelo autor.

Em seu estudo Malik et al. (2021) utilizou as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* imobilizadas, de forma individual e em consorcio para produção de etanol a partir de talo de algodão tratado por hidrólise química (alcalina) e hidrólise enzimática. Foram utilizadas 3 concentrações diferentes de substratos, inicialmente 90 mg/g, 260 mg/g e 280 mg/g durante um período de 96 horas de fermentação. O comportamento da fermentação em consorcio se mostrou mais eficaz para o consumo de açúcares presentes no meio do que as leveduras em processo separado. O consorcio de leveduras imobilizadas se mostrou mais efetivo no consumo dos substratos presentes no meio, bem como, na produção de etanol. A *S. cerevisiae* utilizando o tratamento químico teve uma produção de 41,28 g/L enquanto a *P. tannophilus* 29,88 g/L, quando utilizadas em consorcio apresentaram uma produção de 56,47 g/L e foram utilizados cerca de 92,26% dos açúcares do meio. A resposta se mostrou similar ao obtido nesse estudo para o meio sintético para consumo de açúcares e produção de etanol, quando comparado ao mesmo período de 24 horas durante a fermentação. Ressaltando a eficiência da imobilização das leveduras para o processo de produção de etanol.

5.3.3.3 Crescimento Celular (Biomassa) do consorcio das leveduras

As leveduras *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* foram utilizadas nos meios de fermentação para avaliar o crescimento celular, sendo as primeiras 12 horas da *S. cerevisiae* seguido da *P. tannophilus* por consorcio até o término. A Figura 28 mostra os resultados obtidos nas fermentações durante o tempo de 24 horas. Nesta Figura pode-se observar que com decorrer do processo fermentativo a biomassa teve um aumento para os 3 meios utilizados (MH, MHD e MS). Entretanto, o meio sintético (MS) apresentou maior produção de biomassa ao final do processo de 24 horas se comparado com os hidrolisados. O crescimento celular no meio hidrolisado desintoxicado se estabilizou no período de 20 horas de processo 1,57 g/L, e o meio hidrolisado chegou a produzir uma quantidade de 1,18 g/L de biomassa no tempo de 14 horas se estabilizando neste valor. O meio hidrolisado se mostrou menos eficiente para o a produção de biomassa em relação ao desintoxicado utilizado pelo consorcio de micro-organismos.

Figura 28. Cinética do crescimento celular (biomassa), determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD pelo consorcio de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* em um período de 24 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

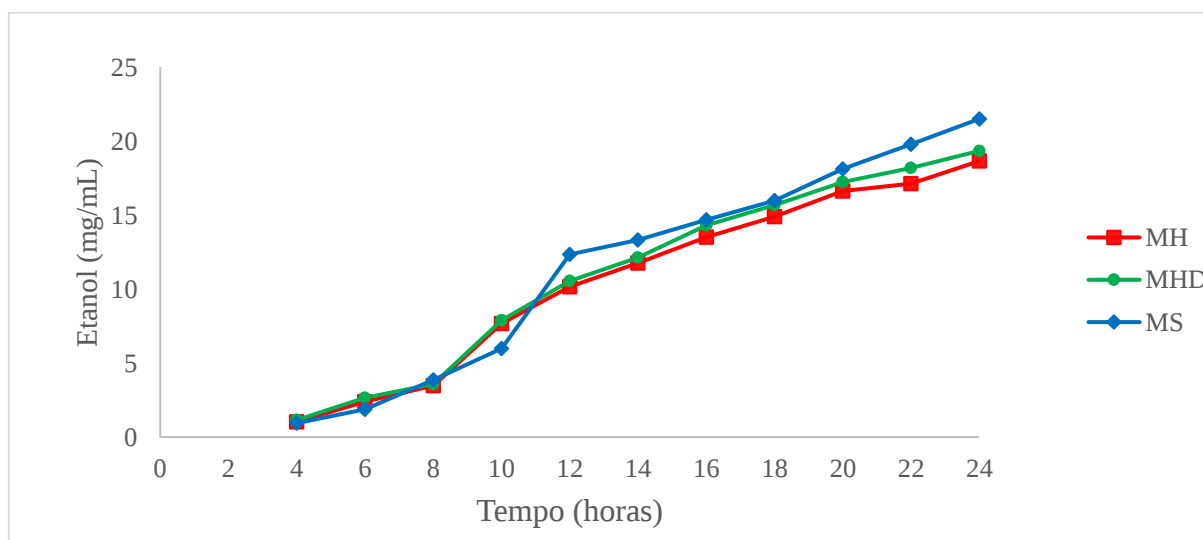
Silva (2016) utilizou o consorcio de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* para produção de biomassa e etanol em um meio sintético e foram analisados o consumo de açúcares, a produção de etanol e a formação de biomassa durante o período de 48 horas de fermentação com uma concentração inicial de substrato de 20 g/L. O autor determinou

a maior produção de biomassa no período de 30 horas chegando a produzir 3,91 g/L, e 4,74 g/L de açúcar residual após 48 horas; a maior produção de etanol pelo consorcio ocorreu em 30 horas (2,98 g/L). Além disso, o estudo constatou que 100% da glicose foi consumida pelas leveduras e que 10,5% da xilose presente não foi consumida. O crescimento celular e consumo de açúcares foram mais eficientes do que o do presente estudo, contudo a concentração inicial de substrato para os parâmetros fermentativos foi menor, em relação ao do presente estudo.

5.3.3.4 Produção de bioetanol de segunda geração pelo consorcio de leveduras

Os valores máximos obtidos na produção de etanol foram de 18,65 g/L para o hidrolisado, 19,34 g/L para o hidrolisado desintoxicado e 21,5 g/L para o meio sintético. O meio sintético apresentou melhor resposta ao consorcio nos parâmetros utilizados de 30 °C, estático com pH inicial de 6,5. A eficiência de sua produção se elevou após o período de 10 horas e se foi aumentando até o final de 24 horas (Figura 29). Os meios hidrolisado e hidrolisado desintoxicado apresentaram comportamento muito similar para a produção de etanol durante o período de 24 horas, esse comportamento também foi possível de ser observado durante o crescimento celular e pH.

Figura 29. Cinética da produção de etanol, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD pelo consorcio de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* em um período de 24 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

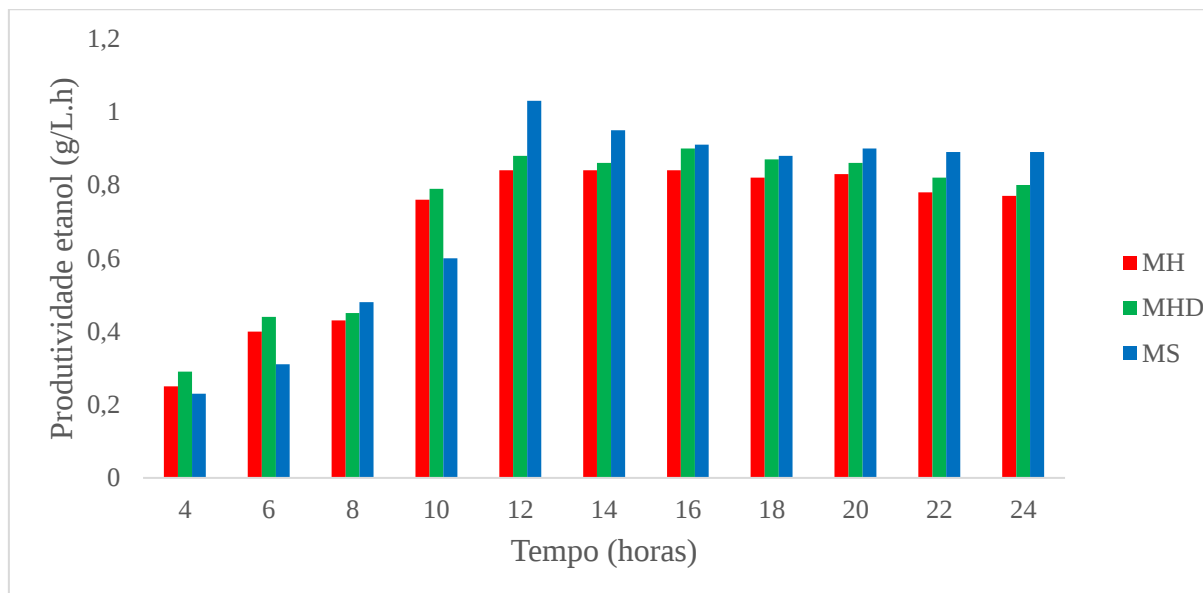
No estudo utilizando o consorcio das leveduras *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* utilizando hidrolisado ácido (H_2SO_4) de pseudocaule de bananeira por Montagnoli (2018), usou uma concentração inicial de 110 g/L de açúcares redutores durante o período de 100 horas de fermentação. O autor constatou o consumo total da glicose presente no meio no período de 98 horas e uma produção de 51,23 g/L de etanol, tal comportamento se mostrou 30% mais eficaz se comparado com a monocultura.

Consortio de *Saccharomyces cerevisiae* e *Scheffersomyces stipitis* foi utilizado por Singh et al. (2014) para obtenção de etanol a partir de casca de arroz utilizando hidrolise enzimática, nesse estudo foram utilizadas concentrações de 10, 25, 50 e 70 g/L de açúcares, obtendo uma produção de 2,5; 5,5g/L; 12,56 e 20,8 g/L respectivamente durante 36 horas. O consorcio das leveduras se mostrou 41% mais eficaz que a monocultura para produção de etanol. Os resultados obtidos com o consórcio neste estudo para a produção de etanol foram similares aos obtidos nesse estudo para o meio sintético com 21,5 g/L.

5.3.3.5 Produtividade

Os resultados de produtividade de etanol do consorcio das leveduras *Pachysolen tannophilus* e *Saccharomyces cerevisiae* está apresentando na Figura 30. Nesta se pode constatar maior produtividade em 12 horas para meio sintético com 1,03 g/L.h e em sequência o meio hidrolisado desintoxicado com 0,90 g/L.h em 16 horas e após, o meio hidrolisado apresentou uma produtividade de 0,84 g/L.h nos tempos de 12, 14 e 16 horas diminuindo posteriormente. O meio sintético apresentou melhores resultados a partir de 12 horas seguidos de uma diminuição até o tempo de 24 horas, contudo seus resultados foram superiores ao MH e ao MHD. Ademais, o meio hidrolisado desintoxicado apresentou melhor resposta aos primeiros períodos da fermentação de 4 a 10 horas, sendo superior ao meio sintético e hidrolisado, após apresentar seu pico em 16 horas ocorreu uma pequena redução até o final do processo.

Figura 30. Produtividade de etanol, determinado em intervalos de 2 horas, durante a fermentação dos meios MS, MH e MHD pelo consorcio de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* em um período de 24 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

O efeito da imobilização da *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* estudadas em monocultura e em co-cultura foi realizado por Malik et al. (2021) comparando hidrólise química (alcalina) e hidrólise enzimática de talo de algodão. Os resultados obtidos para a produtividade de etanol da *S. cerevisiae* foi de 0,078 g/L.h para o resíduo, 0,31 g/L.h para hidrólise ácida e 0,35 g/L.h para a enzimática. Para a levedura *P. tannophilus* apresentaram valores respectivos de 0,058 g/L.h, 0,23 g/L.h e 0,21 g/L.h. O autor ressalta a melhoria da eficiência na produção de etanol para o consorcio de ambas as leveduras obtendo valores de 0,098 g/L.h, 0,46 g/L.h e 0,44 g/L.h para os mesmos parâmetros estudados na monocultura, mostrando a eficácia do processo de imobilização celular e co-cultura das leveduras. Para a produtividade de etanol se mostrou superior no presente trabalho ao obter 1,06 g/L.h para o meio sintético, 0,90 g/L.h para hidrolisado e 0,84 g/L.h para hidrolisado desintoxicado, ambos a partir de casca de arroz utilizando consorcio das leveduras *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* imobilizadas em alginato de sódio. Melhor produtividade do presente estudo ressalta a importância da aplicação da técnica de imobilização celular.

6 CONCLUSÕES

O pré-tratamento com ácido sulfúrico 2% (v/v) utilizando aquecimento em autoclave (121°C e 1 kgf/cm²) durante 10 minutos, apresentou o melhor rendimento para conversão de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa lignocelulósica.

O processo de desintoxicação se mostrou eficaz na redução dos compostos fenólicos presentes e melhorou o rendimento do processo fermentativo realizado pelos micro-organismos. Necessitando assim, um maior estudo de sua aplicação visando o custo do processo e pequena diferença entre o processo sem desintoxicação.

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* apresentaram potencial para produção de etanol em consórcio, ressaltando a eficiência da *S. cerevisiae* em monocultura pelo alto rendimento mostrado.

O consorcio entre as duas leveduras foi eficiente e apresentou maior produção de etanol e consumo dos açúcares fermentescíveis no hidrolisado se comparado com a monocultura.

A imobilização celular em alginato de sódio mostrou eficácia em todos os parâmetros do estudo, ressaltando sua importância em melhorar o rendimento e facilitar o processo fermentativo.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, S. A., CLARK, W., MCCAFFERY, J. M., Cai, Z., Lanctot, A., Slininger, P. J., Liu, Z. L., Gorsich, S. W. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Biofuels**, v. 3, p. 2, 2010
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.
- AQUARONE, E., SCHMIDELL, W., DE ALMEIDA LIMA, U., & BORZANI, W. *Biotecnologia industrial-vol. 4: biotecnologia na produção de alimentos*. Editora Blucher. 2001.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnol Adv**, v.26, n.1, p. 89- 105. 2008.
- BARUAH, J., NATH, B., SHARMA, R., KUMAR, S., DEKA, R., BARUAH, D., KALITA, E. Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. **Front. Energy Res**, v.6, p. 141, 2018
- BEHERA, S.; KAR, S.; MOHANTY, R. C.; RAY, R. C. Comparative study of bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. **Applied Energy**, Orissa, v. 87, p. 96-100, 2010.
- BOBOESCU et al. A two-step optimization strategy for 2nd generation ethanol production using softwood hemicellulosic hydrolysate as fermentation substrate. **Bioresource technology**. 2017
- BOIDIN, J., ADZET, J. M. Deux curieuses levures isolées d'extraits tannants d'origine végétale: *Pachysolen* (nov. gen.) *tannophilus* nov. sp. et *P. pelliculatus* nov. sp. **Bulletin de la Société Mycologique de France**. v. 73, p. 332-342, 1957.
- BRINKMAN M. L. J., CUNHA M. P., HEIJNEN S., WICKE B., GUILHOTO J. J. M, ARNALDO WALTER, FAAIJ A. P.C., HILST F. V.D. Interregional assessment of socio-economic effects of sugarcane ethanol production in Brazil, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 88, p. 347-362, 2018.
- CAETANO, A.C.G.; MADALENO, L.L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia**, v. 2, p. 27-37, 2011.
- CABRAL, A., S. **Tratamentos ácidos de hidrólise e avaliação de parâmetros na produção de etanol celulósico utilizando resíduos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)** 2016. 158 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de alimentos) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São Jose do Rio Preto, 2016.

CASSALES, A. et al. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 4675-4683, 2011.

CASTANHEIRA, D. D. **Estudo sobre produção de etanol em células de *Saccharomyces cerevisiae* com maior atividade da enzima H^+ -ATPase de membrana citoplasmática**. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo De Pesquisa em Ciências Biológicas, Ouro Preto, 2013.

CAVKA, A. et al. Techno-economic evaluation of conditioning with sodium sulfite for bioethanol production from softwood. **Bioresource Technology**. v.196, p. 129-135. 2015.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R.E. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 69, n. 1, p. 67-72, 2004.

CHIARAMONTI, D. Bioethanol: role and production technologies. In: Ranalli P, editor. Improvement of crop plants for industrial end uses. **Dordrecht: Springer**. p. 209–51, 2007.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos (safra 2019/2020). Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em 8 de junho de 2020.

CHRISTOFOLETI-FURLAN, R., M., Portugal, C., B., VARIZE, C., S., MUYNARSK, E., S., M., ALCARDE, A., S., BASSO, L., C. Unraveling Brazilian bioethanol yeasts as novel starters for high-gravity brewing. **Food Research International**. v.135, 2020.

DA SILVA, D. C. M. **PRE-TRATAMENTO E HIDROLISE DA CASCA DE UVA PARA LIBERACAO DE ACUCARES FERMENTESCIVEIS**. 2016. 113 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de alimentos) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São Jose do Rio Preto, 2016.

DA SILVA, C. D. S. R. **Hidrolise acida de bagaco de cana-de-acucar para produção de etanol por fermentacao pelo consorcio *Zymomonas mobilis* CCT4494 e *Pachysolen tannophilus* CCT1891**. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de alimentos) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São Jose do Rio Preto, 2016.

DAFNOMILIS, R. HOEFNAGELS, Y.W. PRATAMA, D.L. SCHOTT, G. LODEWIJKS, M. JUNGINGER. Review of solid and liquid biofuel demand and supply in Northwest Europe towards 2030 – a comparison of national and regional projections. **Renewable Sustainable Energy Rev.**, p. 78. 2017.

DE LIMA, et al. Produção de etanol de segunda geração proveniente do bagaço de pendúculos de caju. **REVISTA CAATINGA**. v.28, n.2, 2015.

DELLA, V. P.; HOTZA, D.; JUNKES, J. A.; OLIVEIRA, A. P. N. Estudo comparativo entre sílica obtida por lixívia ácida da casca de arroz e sílica obtida por tratamento térmico da cinza de casca de arroz. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1175-1179, 2006.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, St. Paul, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EL HARCHI, M., KACHKACH, F. Z. F., EL MTILI, N. Optimization of thermal acid hydrolysis for bioethanol production from *Ulva rigida* with yeast *Pachysolen tannophilus*. **South African Journal of Botany**. v. 115, p. 161-169, 2018.

ELSAYED et al. Biorefining of rice straw by sequential fermentation and anaerobic digestion for bioethanol and/or biomethane production: Comparison of structural properties and energy output. **Bioresource Technology**. v. 268, p. 183-189, 2018.

FAO. Agricultural production: primary crops. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 05 jan. 2021. FAO.

FENGEL, D.; WEGENER, G.; Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter: Berlin, 1989.

FERREIRA, D. S. **Efeito da suplementação mineral com magnésio e cobre no comportamento fisiológico de *Saccharomyces cerevisiae***. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. DA; SILVA, F. D. C. DA. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 623–638, 2009.

FERREIRA, J., SANTOS, V., A., Q., GARCIA-CRUZ, C., H. Ethanol production by co-culture of *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus* using banana peels hydrolysate as substrate. **Acta Scientiarum Technology**. v, 40, 2018.

FOLETTTO, E. L.; HOFFMANN, R.; HOFFMANN, R. S.; PORTUGAL JR., U. L.; JAHN, S. L. Aplicabilidade das Cinzas da Casca de Arroz. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1055-1060, 2005.

FU, N.; PEIRIS, P. Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1091–1097, 27 nov. 2008.

GANDU, B., ROZENFELD, S., HIRSCH, L., O., SCHECHTER, A., CAHAN, R. Immobilization of bacterial cells on carbon-cloth anode using alginate for hydrogen generation in a microbial electrolysis cell. **Journal of Power Sources**. v. 455, 2020.

GARCIA-CRUZ, C. H., FOGGETTI U, SILVA, A. N. Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção. **Quim. Nova**. v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

GROSSI, E. C. **Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose**. 2015. xi. 75 f., il. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Química e Biológica) – Universidade de Brasília, 2015.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 11, p. 933–943, 1994.

HICKERT, L., R., SOUZA-CRUZ, P., B., ROSA, C., A., AYUB, M., A., Z. Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 112-116, 2013.

HIRASAWA, T. et al. *Saccharomyces cerevisiae* and DNA Microarray Analyses: What Did We Learn From It for a Better Understanding and Exploitation of Yeast Biotechnology?. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, n. 2, p. 391-400. 2010.

IEA, *Internactional Energy Agency* (2010). Disponível em:<<http://www.geografiaparatodos.com.br>>. Acessado em: 05/2019.

JESUS, K., R., E. et al. Sustainability assessment of sugarcane production systems: SustenAgro Decision Support System. **Environmental Development**, v. 32, 2019.

KARAGOZ, P., BILL, R. M., OZKAN, M. Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. **Renewable Energy**. 2019.

KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 138-144, 2006.

KOURKOUTAS, Y. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 377-397, 2004

KUMARI, D.; SINGH, R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.90, p. 877–891, 2018.

KÜÜT A., ILVES R., KÜÜT K., RAIDE V., RITSLAID K., J. Influence of European Union Directives on the use of liquid biofuel in the transport sector. **Procedia Eng.**, v. 187, p. 30– 39, 2017.

LAINIOTI, et al. New separation methodologies for distinction of the growth phases of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. **Journal of chromatography A**. v. 1217, p. 1813-1820, 2010.

LIMA, U. et al. *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: **Edgard Blücher LTDA**, 2001.

LIU, Z. et al. Isolation and cationization of hemicelluloses from pré-hydrolysis liquor of Kraft-based dissolving pulp production process. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 1789-1796, 2011.

LIU, X., JENSEN, P. R., WORKMAN, M. Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 559-586, 2012.

- MALIK et al. Co-fermentation of immobilized yeasts boosted bioethanol production from pretreated cotton stalk lignocellulosic biomass: Long-term investigation. **Industrial crops e Products**. v. 159. 2021.
- MALDHURE, A. V.; EHLE, J. D. Pyrolysis of purified kraft lignin in the presence of $AlCl_3$ and $ZnCl_2$. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, p. 844-849, 2013.
- MENON, V., RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012.
- MISHRA, et al. Lignocellulosic ethanol production employing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in packed bed reactor. **Renewable Energy**. p. 1-7. 2016.
- MONTAGNOLI, M. S., FURIGO Jr. A. PRODUCAO DE ETANOL 2G DE PSEUDOCAULE DE BANANEIRA POR COCULTURA MICROBIANA. Congresso brasileiro de engenharia química. 2018.
- MOOD S. H., GOLFESHAN A. H., TABATABAEI M., JOUZANI G. S., NAJAFI G. H., GHOLAMI M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renew Sustain Energy Rev** 2013; 27:77–93.
- MOSCON et al. Comparison of conventional and alternative technologies for the enzymatic hydrolysis of rice hulls to obtain fermentable sugars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 2014.
- MULKO, L., RIVAROLA, C. R., BARBERO, C. A., ACEVEDO, D. F. Bioethanol production by reusable *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in a macroporous monolithic hydrogel matrices. **Journal of biotechnology**. 2016.
- NAUMOVA, E. S., NAUMOV, G. I., MASNEUF-POMARÈDE, I., AIGLE, M., DUBOURDIEU, D. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. **Yeast**, v. 22, n. 14, p. 1099-1115, 2005.
- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, n. 2, p. 375-380, 1944.
- NITZKE, J. A.; BIEDRZYCKI, A. **Terra de arroz**. 2012. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/alimentus/terraearroz/index.htm>. Acesso em: 5 maio. 2019.
- NTAIKOU, et al. Valorization of kitchen biowaste for ethanol production via simultaneous saccharification and fermentation using co-cultures of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipites*. **Bioresource Technology**. 2018
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

OLEA, E.H.; CARRILLO, E.P.; SALDÍVAR, S.O.S. Effects of different acid hydrolyses on the conversion of sweet sorghum bagasse into C5 and C6 sugars and yeast inhibitors using response surface methodology. **Bioresour. Technol.**, v. 119, p. 216-223, 2012.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.

PALMQVIST, E., HAHN-HAGERDAK, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibitors mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol.*, v.74, p.25-33. 2000.

PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2011, v.31, p.20-31.

PÉREZ, S.; SAMAIN, D. Structure and engineering of celluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v. 64, p. 25-116. 2010.

PULIGUNDLA, P., MOK, C., & PARK, S. Advances in the valorization of spent brewer's yeast. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 62, p. 102-350. 2020.

RFA – RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Fueling a high octane future: 2016 Ethanol Industry Outlook**. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/wp-content/uploads/2019/05/RFA_outlook_2019_newlogo.pdf> Acesso em: 28 abril 2019.

RODRIGUEZ, E.; CALLIERI, D. A. S. High yield conversion of sucrose into ethanol by a flocculent *Zymomonas* sp. isolated from sugarcane juice. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 10, p. 745-748, 1986.

ROMERO, I., SANCHEZ, S., MOYA, M., CASTRO, E., RUIZ, E., BRAVO, V. Fermentation of olive tree pruning acid-hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 36, p. 108-115. 2007.

SAMBUSITI, et al. One-Pot dry chemo-mechanical deconstruction for bioethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. v. 181, p. 200-206, 2015.

SAHA B.; COTTA M. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomassa and Bioenergy**. 32, 971 – 977. 2008.

SAKAMOTO et al. Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Journal of Biotechnology**. v. 158, p.203-210, 2012.

SALEH, M. et al. Valorization of olive stones for xylitol and ethanol production from dilute acid pretreatment via enzymatic hydrolysis and fermentation by *Pachysolen tannophilus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, n. 1, p. 286–293, 2014.

SANTOS, J. R. A., GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campina Grande. v. 11. n. 1. p. 27-33. 2009.

SATHESH-PRABU, C.; MURUGESAN, A. G. Potential utilization of sorghum field waste for fuel ethanol production employing *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2788–2792, 2011

SEWSYNKER-SUKAI, Y., DAVID, A., N., KANA, E., B., G. Recent developments in the application of kraft pulping alkaline chemicals for lignocellulosic pretreatment: Potential beneficiation of green liquor dregs waste. **Bioresource Technology**. v. 306, 2020

SHADBAHR, J., KHAN, F., ZHANG, Y. Kinetic modeling and dynamic analysis of simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to bioethanol. **Energy Convers. Manage.**, v. 141, p. 236-243. 2017.

SILVA, M. D., SANTOS, V. A. Q., ERNANDES, F. M. P. E., GARCIA-CRUZ, C. H. Acid hydrolysis of corn cob for the production of second generation ethanol by *saccharomyces cerevisiae* atcc 26602. **International Journal of Development Research**. v. 10, 2020.

SIVAGURUNATHAN, P., KUMAR, G., MUDHOO, A., RENE, E. R., SARATALE, G. D., KOBAYASHI, T., XU, K., KIM, S.-H., KIM, D.-H. Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass: an overview of pre-treatment methods, inhibitor effects and detoxification experiences. **Renew. Sustain. Energy Rev.**, v. 77, p. 28-42, 2017.

SLININGER, P. J.; BOLEN, P. L.; KURTZMAN C. P. *Pachysolen tannophilus*: properties and process considerations for ethanol production from D-xylose. **Enzyme Microb. Technol.** v. 9, jan., 1987.

SINGH, A., BISHNOI, N. R., BAJAR S. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. **Fuel**. v. 116, p. 699-702. 2014.

Soares, L.C. S. R.; Chandel, A. K.; Pagnocca, F. C.; Gaikwad, S. C.; Rai, M.; Da Silva, S. S. Screening of yeasts for selection of potential strains and their utilization for in situ microbial detoxification (ISMD) of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Indian Journal of Microbiology**. v. 56, n. 172, 2016.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 19-22, 1952.

STEPANOV, N. EFREMENKO, E. Immobilized cells of *Pachysolen tannophilus* yeast for ethanol production from crude glycerol. **New biotechnology**. 2016.

SUN, Z. et al. Production of fuel ethanol from bamboo by concentrated sulfuric acid hydrolysis followed by continuous ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10929-10935, 2011.

TABAÑAG, I., D., F., CHU, I-M., WEI, Y-H., TSAI, S-L. Ethanol production from hemicellulose by a consortium of different genetically modified *sacharomyces cerevisiae*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. p. 1-11, 2018.

THANGAVELU, S. K., RAJKUMAR, T. PANDI, D. K., AHMED, A. S., ANI, F. N. Microwave assisted acid hydrolysis for bioethanol fuel production from sago pith waste. **Waste Management**. v.86. p. 80-86. 2019.

TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion. In: _____. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Madrid: Elsevier, 2011. p. 149-176

TRAKARNPAIBOON, S., SRISUK, N., PIYACHOMKWAN, K., YANG, S.-T., KITPREECHAVANICH, V. l-Lactic acid production from liquefied cassava starch by thermotolerant *Rhizopus microsporus*: characterization and optimization. **Process Biochemistry**, v. 63, p. 26-34. 2017.

TRINCA, N. R. R.; BRUNATTI, A. C. S.; GARCIA-CRUZ, C. H. The influence of the presence of phenolic compounds in culture medium containing acid hydrolysate of soybean hulls as substrate to produce ethanol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, p. 1-10, 2017.

VARAPRASAD, K., JAYARAMUDU, T., KANIKIREDDY, V., TORO, C., SADIKU, E. R. Alginate-based composite materials for wound dressing application:A mini review. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, p. 116-125, 2020.

WALKER, G. M. Yeast Physiology and Biotechnology. **Chichester: John Wiley e Sons**, p. 362, 1998

WATANABE et al. Ethanol production by repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali – treated rice straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Bioresource Technology**. v. 123, p. 695-698. 2012.

WEI, P. et al. A review of membrane technology for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 388-400, 2014.

XUE, J., WU, Y., FU, X., LI, N., SUN, J., QIAO, Y. Study on degradation characteristics and bacterial community structure changes of imoobilized cells in straw-alginate beads in marine environment. **Bioresource Technology Reports**, v.10, 2020.

YOSHIKAWA, K., HIRASAWA, T., SHIMIZU, H. Effect of malic enzyme on ethanol production by *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.119, p. 82-84, 2015.

ZHAO, L.; ZHANG, X.; TAN, T. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1156–1161, 2008.

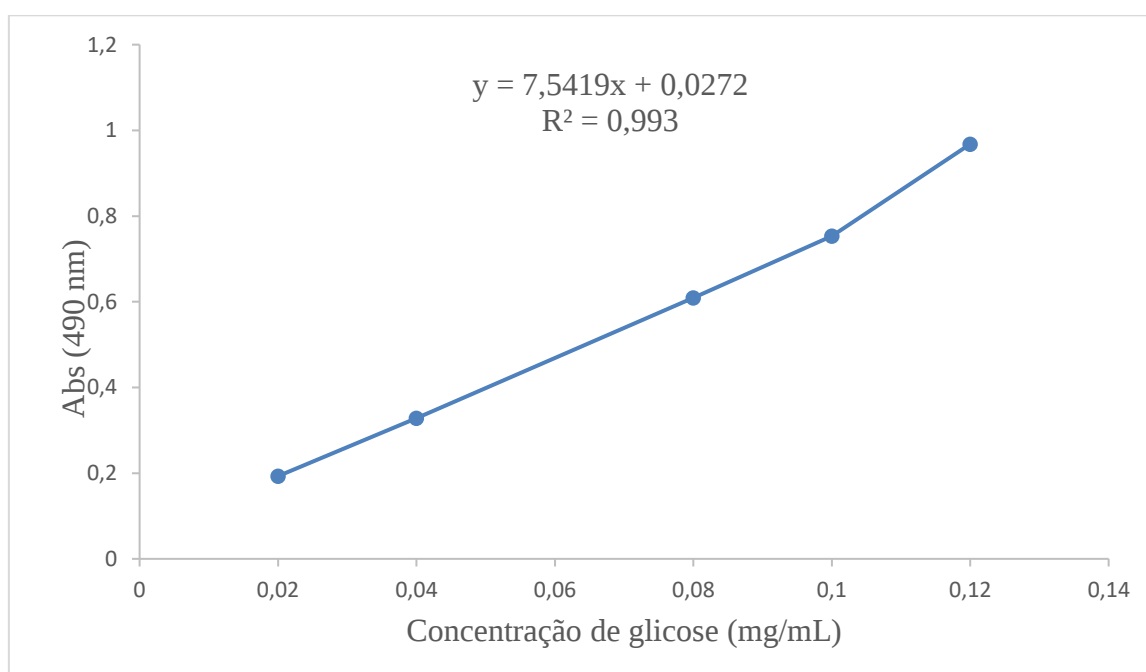
ZHAO, J.; XIA, L. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. **Biochemical Engineering Journal**. Elsevier. v. 49. p. 28-32. 2010.

Zhu, Y., Shi, J., Shen, W., Chen, H., Dong, X. & Ruan, M. Preparação de novas esferas de sílica mesoporosa ocas e suas propriedades de liberação sustentada. **Nanotecnologia**, v. 16, n. 11, p. 26-33, 2005.

APÊNDICES

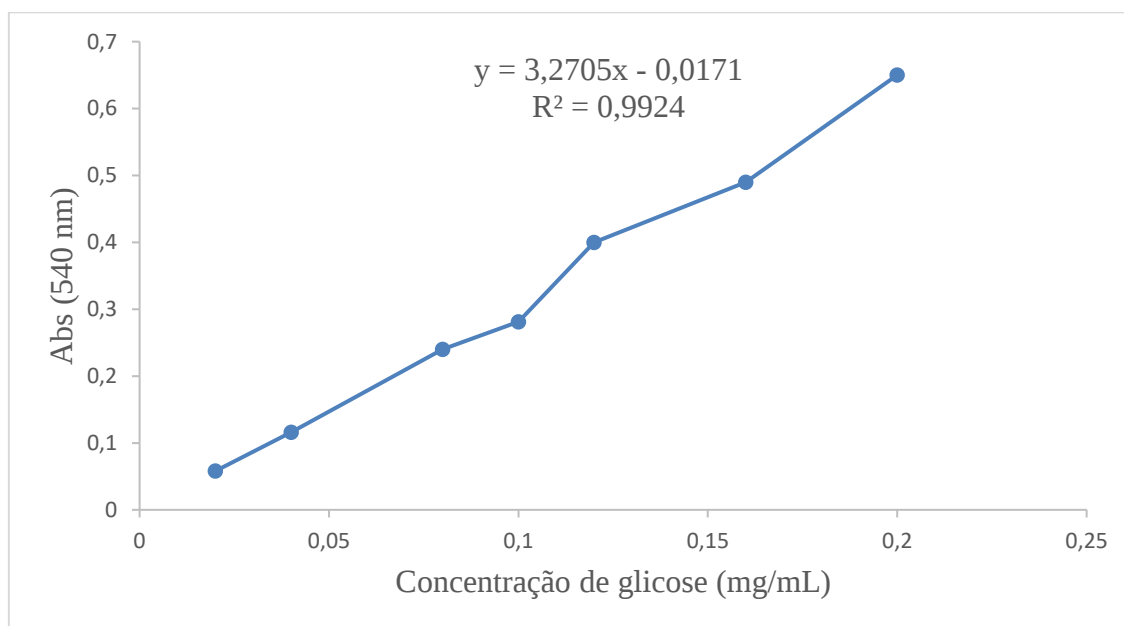
APÊNDICE A – Curva de calibração da Concentração de Açúcares Totais

Figura 1 A. Curva e calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose(mg/mL) pelo método de Dubois et al. (1956).



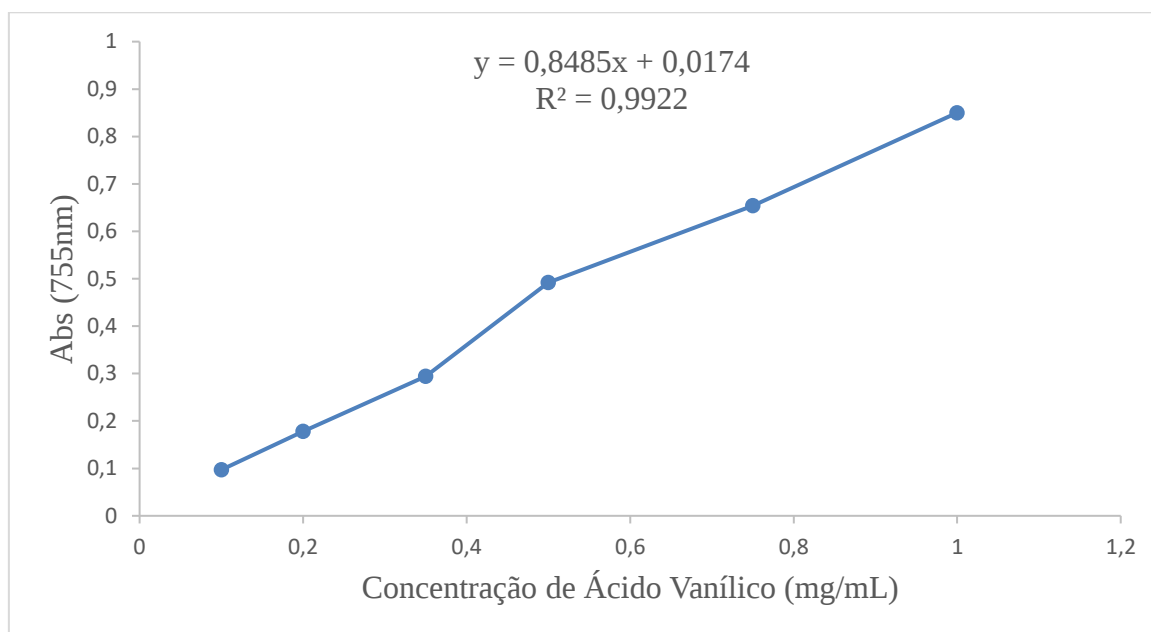
APÊNDICE B – Curva de calibração da concentração de Açúcares Redutores.

Figura 1 B. Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (mg/mL) pelo método e Somogyi e Nelson (1952).



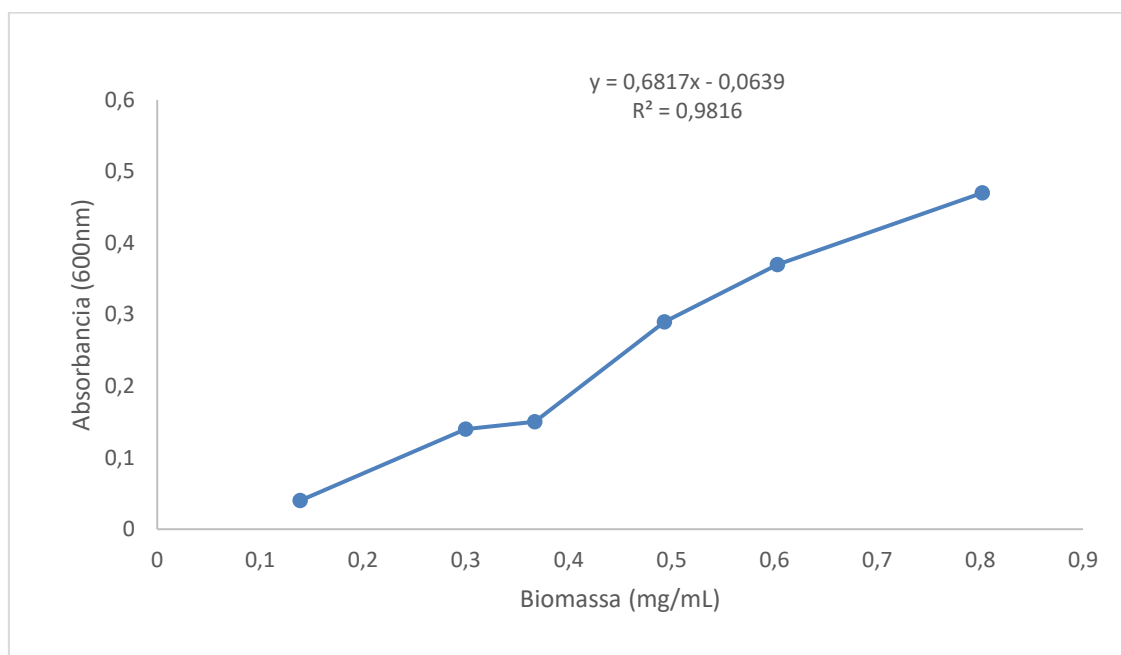
APÊNDICE C – Curva de calibração da Concentração de Ácido Vanílico.

Figura 1 C. Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de Ácido Vanílico (mg/mL) pelo método de Folin-Ciocalteu.



APÊNDICE D – Curva de calibração do crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Figura 1 D. Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, após o período de 24 horas.



APÊNDICE E – Curva de calibração do crescimento celular da levedura *Pachysolen tannophilus*.

Figura 1 E. Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações da levedura *Pachysolen tannophilus*, após o período de 24 horas.

