



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

Mariane Daniella da Silva

Produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae*
ATCC 26602 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho (*Zea mays* L.).

São José do Rio Preto

2018

Mariane Daniella da Silva

Produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae*
ATCC 26602 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho (*Zea mays* L.).

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

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz.

São José do Rio Preto

2018

Silva, Mariane Daniella da.

Produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho (*Zea mays* L.). / Mariane Daniella da Silva. -- São José do Rio Preto, 2018
100 f. : il.

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Bioetanol. 3. Levedos. 4. Biomassa. 5. Lignina. 6. Celulose. 7. Hemicelulose. 8. Milho. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 661.722

Mariane Daniella da Silva

Produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae*
ATCC 26602 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho (*Zea mays* L.).

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

Banca Examinadora

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

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

Prof. Dr^a. Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes
UNIP – São José do Rio Preto/SP

São José do Rio Preto/SP

02 de Março de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio e pela confiança que sempre tiveram em mim, obrigada por acreditarem no meu potencial. Agradeço a minha mãe por sempre me ajudar a seguir em frente e me manter firme.

Ao meu querido orientador, Professor Crispin, muito obrigada pela grande ajuda de sempre, por além de tudo ser um ótimo amigo, pela confiança que sempre deposita em mim e por nunca desistir do meu trabalho.

Agradeço o apoio financeiro do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil.

Agradeço aos meus amigos por todo apoio que me deram durante esses dois anos de mestrado, em casa e no IBILCE.

Agradeço as colegas do laboratório, por toda a ajuda e pela paciência.

Agradeço também aos membros da banca, obrigada Professor Javier e muito obrigada a Professora Fernanda, que também participou da minha qualificação e foi de grande ajuda.

RESUMO

O milho é uma das culturas mais produzidas no Brasil e durante o seu processamento apresenta como rejeitos o sabugo, caule, folhas e a palha que podem ser utilizados como biomassa para produção de bioetanol de segunda geração. Estima-se que para cada tonelada de milho produzido 2,3 toneladas são rejeitos. Entretanto, para a utilização deste substrato é necessário um tratamento inicial de hidrólise ácida, básica ou enzimática para a remoção da lignina e hemicelulose deixando exposta a celulose, que pode ser utilizada como substrato por microrganismos. Portanto, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a partir do sabugo de milho hidrolisado que foi utilizado como substrato. Para isto variaram-se diferentes concentrações de ácido sulfúrico (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0%) em diferentes tempos de aquecimento em autoclave (15 e 30 minutos). Foi avaliado o efeito da desintoxicação nos hidrolisados para a remoção de compostos inibidores da fermentação produzidos durante a hidrólise nos diferentes tempos de aquecimento e o efeito de diferentes velocidades de agitação (0, 50 e 100 rpm) na fermentação do hidrolisado. Foi avaliada a produção de etanol utilizando o meio hidrolisado de sabugo de milho (na concentração de 20, 40 e 60 g/L de açúcares redutores). Também foi estimada a produção de etanol utilizando um meio sintético adicionado de glicose (nas concentrações de 40 e 60 g/L) que serviu como padrão de comparação na utilização do meio contendo o sabugo de milho hidrolisado. Os resultados indicaram que a melhor concentração de H₂SO₄ para realização da hidrólise foi de 2,5% com 30 min. de aquecimento. A desintoxicação do hidrolisado resultou na diminuição da concentração de compostos fenólicos. Foi realizada uma avaliação da produção de etanol após a fermentação de 48 h do hidrolisado, apresentando o melhor resultado em 36 h de fermentação, 7,04 g/L de etanol no meio incubado com agitação de 50 rpm e 8,11 g/L de etanol no meio com agitação de 100 rpm. Portanto, tem-se que o hidrolisado do sabugo de milho é uma opção alternativa para a produção de etanol de segunda geração. Além disso, a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602 foi capaz de utilizar o hidrolisado sem desintoxicação para produção de etanol.

Palavras-chave: Bioetanol, levedura, biomassa, lignina, celulose, hemicelulose.

ABSTRACT

Corn is one of the most produced crops in Brazil and it can be grown in any soil or climate. During its processing, it presents as tailings the cob, stem, leaves and straw that can be used as biomass for bioethanol production. It is estimated that for each ton of corn produced 2,3 tons are tailings. However, the use of this substrate requires an initial treatment of acidic, basic or enzymatic hydrolysis for the removal of lignin and hemicellulose exposing cellulose, which can be used as a substrate by microorganisms. Therefore, the aim of this research is to study the ethanol production on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 from hydrolyzed corn cob which was used as substrate. For this purpose, different concentrations of sulfuric acid (2,5, 5,0, 7,5 and 10,0%) were used under different autoclaving heating periods (15 and 30 minutes). The effect of detoxification on hydrolysates to remove fermentation inhibitor compounds produced during the hydrolysis at the different heating periods and the effect of different stirring rates (0, 50 and 100 rpm) was evaluated in the fermentation of hydrolyzate. The ethanol production was evaluated using a hydrolyte environment (at concentration of 40 and 60 g/L). The ethanol production was also evaluated using a synthetic medium added with glucose (at concentrations of 20, 40 and 60 g/L), which will serve as a comparison standard when using the medium containing hydrolyzed corn cob. The results indicate that the best H₂SO₄ concentration for hydrolysis was 2,50% acid with 30 min. of heating. The detoxification of the hydrolyzates resulted in a decrease on the concentration of phenolic compounds. A partial evaluation of the ethanol production was carried out after fermentation of 48 h of the hydrolyzates, providing the best result within 36 h of fermentation, 7,04 g/L of ethanol in the medium incubated with agitation of 50 rpm and 8,11 g/L ethanol in the medium with 100 rpm stirring. This concludes that corn cob hydrolyzates are an advantageous option for the production of ethanol. Besides, the yeast *S. cerevisiae* ATCC 26602 was able to use the hydrolyzate without detoxification for ethanol production.

Keywords: Bioethanol, yeast, biomass, lignin, cellulose, hemicellulose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corte transversal de um sabugo de milho mostrando sua estrutura suas partes constituintes.	21
Figura 2 – Representação da estrutura da parede celular de uma biomassa lignocelulósica mostrando cada um de seus blocos constituintes.	22
Figura 3 – Estrutura de um polímero de celulose apresentando a unidade básica de celobiose e as ligações β -(1-4) entre as glicoses.	23
Figura 4 – Estrutura do polímero de hemicelulose representada por alguns de seus açúcares constituintes.	24
Figura 5 – Estrutura de uma macromolécula de lignina.	26
Figura 6 – Representação das vias de formação de açúcares fermentescíveis e de compostos inibidores durante o tratamento ácido utilizado para degradar materiais lignocelulósicos.	32
Figura 7 - Fluxograma do processo de produção de etanol de segunda geração.	41
Figura 8 – Resultados provenientes das análises de açúcares totais do sabugo de milho hidrolisado com diferentes concentrações de H_2SO_4 e aquecimento de 15 e 30 min., com e sem desintoxicação.	49
Figura 9 – Resultados provenientes das análises de açúcares redutores do sabugo de milho hidrolisado com diferentes concentrações de H_2SO_4 e aquecimento de 15 e 30 min., com e sem desintoxicação.	51
Figura 10 – Resultados provenientes das análises de compostos fenólicos do sabugo de milho hidrolisado com diferentes concentrações de H_2SO_4 e aquecimento de 15 e 30 min., com e sem desintoxicação.	53
Figura 11 – Concentrações de açúcares totais em g/L remanescentes após realização do processo de fermentação completo com aquecimento de 15 e 30 min. no hidrolisado com 2,5% de H_2SO_4 e desintoxicado.	57
Figura 12 – Concentrações de açúcares redutores em g/L remanescentes após realização do processo de fermentação completa com aquecimento de 15 e 30 min no hidrolisado com 2,5% de H_2SO_4 e desintoxicado.	57
Figura 13 – Resultado das análises de compostos fenólicos após hidrólise com H_2SO_4 2,5%, e aquecimento em autoclave durante 15 e 30 min. no hidrolisado desintoxicado.	58
Figura 14 – Produção de etanol por <i>S. cerevisiae</i> no meio de cultura contendo o hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 36 horas no hidrolisado desintoxicado.	59
Figura 15 – Comportamento do pH durante a produção de etanol por <i>S. cerevisiae</i> no meio de cultura contendo o hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 36 horas no hidrolisado desintoxicado.	61
Figura 16 – Concentrações de compostos fenólicos em g/L remanescentes após realizar o processo de fermentação completo com aquecimento de 30 min. no hidrolisado desintoxicado.	63
Figura 17 – Comportamento da Produção de etanol por <i>S. cerevisiae</i> e do seu crescimento celular no meio de cultura contendo o hidrolisado de sabugo de milho com 2,5% de H_2SO_4 , e aquecimento de 30 min. incubado a 30 °C durante 48 h no hidrolisado desintoxicado, com 50 e 100 rpm.	64

Figura 18 – Crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> no meio hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30°C durante 24 h no hidrolisado desintoxicado, contendo 20 g/L de AR.....	67
Figura 19 – Crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> no meio hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30°C durante 24 h no hidrolisado desintoxicado, contendo 40 g/L de AR.....	68
Figura 20 – Crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> no meio hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30°C durante 24 h no hidrolisado não desintoxicado, contendo 40 g/L de AR.....	69
Figura 21 – Produção de etanol por <i>S. cerevisiae</i> no meio hidrolisado desintoxicado de sabugo de milho com 2,5% de H ₂ SO ₄ , e aquecimento de 30 min., com 20 g/L de AR, incubado a 30 °C durante 24 h.	70
Figura 22 – Produção de etanol por <i>S. cerevisiae</i> no meio hidrolisado desintoxicado de sabugo de milho com 2,5% de H ₂ SO ₄ e aquecimento de 30 min., com 40 g/L, incubado a 30 °C durante 24 h.	70
Figura 23 – Produção de etanol por <i>S. cerevisiae</i> no meio hidrolisado não desintoxicado de sabugo de milho com 2,5% de H ₂ SO ₄ e aquecimento de 30 min., com 40 g/L, incubado a 30 °C durante 24 h.	71
Figura 24 – Concentrações de açúcares redutores em g/L remanescentes do processo de fermentação completo com aquecimento de 30 min. no hidrolisado desintoxicado com 2,5% de H ₂ SO ₄ e 20 g/L de AR.....	72
Figura 25 – Concentrações de açúcares redutores em g/L remanescentes do processo de fermentação completo com aquecimento de 30 min. no hidrolisado desintoxicado com 2,5% de H ₂ SO ₄ e 40 g/L de AR.....	72
Figura 26 – Concentrações de açúcares redutores em g/L remanescentes do processo de fermentação completo com aquecimento de 30 min. no hidrolisado não desintoxicado com 2,5% de H ₂ SO ₄ e 40 g/L de AR.....	73
Figura 27 – Valores remanescentes de compostos fenólicos em concentração de ácido vanílico em g/L do processo de fermentação do meio hidrolisado desintoxicado com 2,5% de H ₂ SO ₄ e 20 g/L de AR.....	73
Figura 28 – Valores remanescentes de compostos fenólicos em concentração de ácido vanílico em g/L do processo de fermentação do meio hidrolisado desintoxicado com 2,5% de H ₂ SO ₄ e 40 g/L de AR.....	74
Figura 29 – Valores remanescentes de compostos fenólicos em concentração de ácido vanílico em g/L do processo de fermentação do meio hidrolisado não desintoxicado com 2,5% de H ₂ SO ₄ e 40 g/L de AR.....	74
Figura 30 – Crescimento celular da levedura <i>S. crevisiae</i> em meio sintético contendo 40 g/L de glicose.	79
Figura 31 – Crescimento celular da levedura <i>S. cerevisiae</i> em meio sintético contendo 60 g/L de glicose.	80
Figura 32 – Produção de etanol pela levedura <i>S. cerevisiae</i> em meio sintético contendo 40 g/L de glicose.	81
Figura 33 – Produção de etanol pela levedura <i>S. cerevisiae</i> em meio sintético contendo 60 g/L de glicose.	81
Figura 34 – Curva padrão de glicose para açúcares totais.....	95
Figura 35 – Curva padrão de glicose para açúcares redutores.	96

Figura 36 – Curva padrão de ácido vanílico para cálculo do teor de compostos fenólicos.	97
Figura 37 – Curva padrão de glicose para crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de materiais lignocelulósicos que são considerados resíduos agroindustriais.	19
Tabela 2 – Propriedades físicas e químicas do sabugo de milho e sua composição.	21
Tabela 3 – Métodos que podem ser utilizados na desintoxicação de hidrolisados lignocelulósicos.	38
Tabela 4 – Meio de manutenção utilizado para levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602.	43
Tabela 5 – Composição do Meio Sintético utilizando nos ensaios para a fermentação.	45
Tabela 6 – Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores (g/L) e compostos fenólicos (ác. vanílico g/L) liberados durante a hidrólise ácida com 2,5% de H ₂ SO ₄ , com aquecimento de 15 e 30 min., antes e após desintoxicação.	55
Tabela 7 – Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores (g/L) e compostos fenólicos [ác. vanílico] (g/L) durante a hidrólise ácida com 2,5% de H ₂ SO ₄ , e com aquecimento de 30 min., antes e após desintoxicação.	62
Tabela 8 – Valores de concentração de açúcares em g/L remanescentes do processo de fermentação completo com aquecimento de 30 min. no hidrolisado desintoxicado com concentração de 40 g/L, com rotação de 50 e 100 rpm.	63
Tabela 9 – Comportamento do pH do meio de fermentação durante a produção de etanol por <i>S. cerevisiae</i> no meio de cultura contendo o hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 48 h no hidrolisado desintoxicado.	65
Tabela 10 – Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores (g/L) e compostos fenólicos (ác. vanílico g/L) liberados durante a hidrólise ácida com 2,5% de H ₂ SO ₄ , e com aquecimento de 30 min., antes e após desintoxicação.	66
Tabela 11 – Comportamento do pH do meio de fermentação contendo o hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 24 h no hidrolisado desintoxicado, com 20 g/L de AR.	75
Tabela 12 – Comportamento do pH do meio de fermentação contendo o hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 24 h no hidrolisado desintoxicado, com 40 g/L de AR.	76
Tabela 13 – Comportamento do pH do meio de fermentação contendo o hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 24 h no hidrolisado não desintoxicado, com 40 g/L de AR.	76
Tabela 14 – Determinação do pH do meio sintético de fermentação contendo as concentrações de 40 e 60 g/L de glicose em uma fermentação de 18 horas.	78
Tabela 15 – Concentrações de glicose (g/L) e absorbâncias obtidas na construção da curva padrão para quantificação de açúcares totais.	95
Tabela 16 – Concentrações de glicose (g/L) e absorbâncias determinadas na obtenção da curva padrão de glicose para açúcares redutores.	96
Tabela 17 – Concentrações de ácido vanílico (g/L) e absorbâncias determinadas na obtenção da curva padrão de ácido vanílico para determinação de compostos fenólicos.	97
Tabela 18 – Peso celular da levedura (g/L) e absorbâncias determinadas na obtenção da curva do crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 ETANOL	15
3.2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	16
3.3 BIOMASSA CELULÓSICA	17
3.4 MILHO	19
3.5 ESTRUTURA LIGNOCELULÓSICA.....	22
3.5.1 Celulose	22
3.5.2 Hemicelulose	24
3.5.3 Lignina	25
3.6 HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	27
3.6.1 Pré-tratamento	27
3.6.2 Pré-tratamento físico	28
3.6.3 Pré-tratamento térmico	29
3.6.4 Pré-tratamento químico	29
3.7 HIDRÓLISE ÁCIDA.....	30
3.8 FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS.....	31
3.8.1 Ácidos Carboxílicos	33
3.8.2 Derivados de Furanos	33
3.8.3 Compostos Fenólicos	35
3.8.4 Outros Compostos Inibitórios	36
3.9 DESINTOXICAÇÃO	37
3.10 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	41
4.2 MATÉRIA-PRIMA	41
4.3 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA	42
4.4 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA.....	42
4.5 DESINTOXICAÇÃO DO HIDROLISADO	42

4.6	MICROORGANISMO	43
4.7	MEIO DE MANUTENÇÃO	43
4.8	ATIVAÇÃO DA LEVEDURA	43
4.9	INÓCULO	43
4.10	PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	44
4.11	MEIOS DE FERMENTAÇÃO.....	44
4.11.1	Meio sintético (Padrão)	44
4.11.2	Meio contendo o sabugo de milho hidrolisado.....	45
4.12	CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	45
4.12.1	Avaliação das variáveis que podem influenciar a levedura <i>S. cerevisiae</i>	45
4.12.2	Avaliação das fermentações utilizando os hidrolisados de sabugo de milho	45
4.13	MÉTODOS ANALÍTICOS	46
4.13.1	Determinação do pH final.....	46
4.13.2	Determinação da concentração celular.....	46
4.13.3	Determinação de etanol.....	46
4.13.4	Determinação de açúcares totais (AT).....	47
4.13.5	Determinação de açúcares redutores (AR)	47
4.13.6	Determinação do teor de compostos fenólicos	47
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	HIDRÓLISE ÁCIDA.....	48
5.1.1	Pré-tratamento da biomassa e Desintoxicação do hidrolisado.....	48
5.1.2	Determinação de açúcares totais e redutores.....	48
5.1.3	Determinação de compostos fenólicos.....	53
5.1.4	Determinação do tempo de aquecimento da hidrólise	55
5.2	PROCESSO FERMENTATIVO	56
5.2.1	Meio de fermentação contendo o hidrolisado de sabugo de milho	56
5.2.2	Processo fermentativo completo utilizando o meio contendo o hidrolisado de sabugo de milho nas concentrações de 40 e 60 g/L	61
5.2.3	Processo fermentativo completo utilizando o meio contendo o hidrolisado de sabugo de milho e incubação de 24 horas	65
5.2.4	Processo fermentativo completo utilizando um meio contendo 40 e 60 g/L de glicose como meio padrão de comparação	77
6.	CONCLUSÕES	82

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
8. ANEXOS	95

1. INTRODUÇÃO

A preocupação mundial com o esgotamento de combustíveis fósseis e a preocupação com o aumento das emissões de gases de efeito estufa (GEE) na atmosfera têm motivado a busca por alternativas renováveis de energia, tornando a produção de bioetanol interessante e vantajosa para o Brasil e para outros países, uma vez que apresenta uma matriz energética limpa.

O etanol, também denominado etanol de primeira geração, é um biocombustível produzido a partir da fermentação de açúcares fermentescíveis obtidos de matérias-primas vegetais, como cana-de-açúcar, milho, trigo e beterraba açucareira. Quando comparado com a gasolina e com o diesel, o etanol é uma alternativa menos poluente ao meio ambiente.

Contudo, resíduos são gerados pela produção de etanol e pela indústria alimentícia, tornando-se um grande problema ambiental. Esses resíduos apresentam em sua parede celular lignina, hemicelulose e celulose, que, quando hidrolisadas liberam açúcares fermentescíveis, que podem ser utilizados por microrganismos, produzindo etanol de segunda geração.

Pesquisas para a reutilização de resíduos como substratos para produção de etanol buscam solucionar o problema da contaminação ambiental gerada por eles, como por exemplo, o uso da conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis para obtenção do etanol de segunda geração. Essa técnica é baseada em quatro fases: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação do produto.

O pré-tratamento geralmente consiste na diminuição do tamanho da partícula do resíduo, enquanto a hidrólise que é a quebra de ligações químicas pode ser realizada por meio de métodos químicos, físicos ou biológicos.

Na fermentação alcoólica, o microrganismo mais frequentemente utilizado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pois é capaz de produzir etanol em altas concentrações, finalizando o processo com a destilação para a obtenção do produto.

Em trabalhos de pesquisa realizados no laboratório de Biopolímeros do Departamento de Engenharia de Alimentos, no IBILCE/UNESP tem sido utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, cedida pelo grupo do Dr. Jorge Rocha do departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra (Coimbra) e tem mostrado grande capacidade de adaptação em diferentes hidrolisados, mesmo sem esterilização ou desintoxicação destes. Além disso, essa levedura pode ser adaptada a

diferentes condições fermentativas e meios de cultura. Portanto, nesta pesquisa foi utilizada a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602.

Como visto no contexto apresentado, tornam-se importantes os estudos para uma maior utilização da biomassa de resíduos agroindustriais, como, por exemplo, resíduos e subprodutos da cultura de milho. Uma vez que o Brasil é um dos maiores produtores desse vegetal, sendo, a cada tonelada colhida, geradas 2,3 toneladas de resíduos, uma quantidade de biomassa considerável que poderia ser melhor aproveitada.

O objetivo principal deste trabalho foi estudar as variáveis envolvidas (concentração de H_2SO_4 e tempo de hidrólise, agitação e tempo de fermentação) na produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602, utilizando como substrato o sabugo de milho hidrolisado.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a partir sabugo de milho hidrolisado que foi utilizado como substrato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a hidrólise ácida do sabugo de milho utilizando diferentes concentrações de ácido sulfúrico (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0%) submetidas a diferentes tempos de aquecimento em autoclave (15 e 30 minutos);
- Avaliar o efeito da desintoxicação dos hidrolisados para a remoção de compostos inibidores da fermentação produzidos durante a hidrólise nos diferentes tempos de aquecimento;
- Avaliar a produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, utilizando um meio sintético adicionado de glicose (nas concentrações de 40 g/L e 60 g/L) que serviu como padrão de comparação;
- Avaliar a produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, utilizando um meio contendo o sabugo de milho hidrolisado (nas concentrações de 20, 40 e 60 g/L);
- Determinar o efeito de diferentes velocidades de agitação (0, 50 e 100 rpm) durante a fermentação nas condições para produção de etanol;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ETANOL

Nos países com alto consumo de combustíveis automotivos, a utilização de etanol está aumentando. Ele também é conhecido como bioetanol de primeira geração e é uma alternativa renovável de energia gerada a partir da fermentação de açúcares obtidos de uma grande variedade de matérias-primas vegetais, que são fontes renováveis, como por exemplo, a cana-de-açúcar, o milho, o trigo, a mandioca, a beterraba açucareira e materiais lignocelulósicos, sendo que, atualmente, mais de 90% da produção mundial provém do milho e da cana-de-açúcar (CORTEZ et al., 2010).

O Brasil é o pioneiro no uso de biocombustíveis e atualmente é o maior produtor de etanol de cana-de-açúcar do mundo, sendo líder na tecnologia da sua produção (PACHECO, 2011). Ainda, é o segundo maior produtor mundial de bioetanol, atrás apenas dos Estados Unidos, que, no entanto, utilizam o milho como matéria-prima para sua produção. Na safra de 2013/2014, a produção brasileira foi de aproximadamente 25 bilhões de litros de etanol total, sofrendo um acréscimo de 20% em relação à safra 2012/2013 (UNICA, 2015). Em 2015/2016, foram produzidos 30 bilhões de litros do combustível (EPE, 2016).

A produção de bioetanol no Brasil surgiu na década de 70, quando o preço do barril de petróleo se elevou subitamente, dando início à primeira grande crise do petróleo em 1973. Em 1975, criou-se o Proálcool – Programa Nacional do Álcool, que visava a diminuir a importação de petróleo e a dependência da utilização de combustíveis fósseis, que são recursos não renováveis (CARVALHO et al., 2013).

Outro objetivo da produção de bioetanol, além da substituição da gasolina, é a redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE), pois a queima de combustíveis fósseis representa aproximadamente 82% das emissões dos gases poluentes do meio ambiente, e o uso desse biocombustível reduz a emissão de carbono para a atmosfera (LAL, 2004; DEMIRBAS, 2009).

Portanto, seja pela preocupação mundial com o esgotamento de combustíveis fósseis ou pela preocupação com o aumento das emissões de gases de efeito estufa na atmosfera, o etanol de cana-de-açúcar, que apresenta uma matriz energética limpa quando comparado às outras opções, representa uma alternativa interessante e vantajosa, para o Brasil e para outros países, na substituição dos combustíveis fósseis (CANILHA et al., 2010).

Até o momento, o etanol obtido do caldo de cana-de-açúcar é o único combustível capaz de atender à demanda mundial por uma energia renovável, com baixo custo e com baixo poder poluente. As emissões gasosas da queima de etanol são 60% menores do que as emissões da queima da gasolina, além de que o CO₂ que é emitido é reabsorvido pela própria cana (CORTEZ et al., 2010).

Apesar de o bioetanol brasileiro apresentar o menor custo de produção do mundo, existem alguns problemas relacionados à sua geração, pois, para sua obtenção a partir da cana-de-açúcar é necessário que a área cultivável seja ampliada para atender o crescimento da demanda interna e externa para produção de açúcar e para produção de álcool (STRAPASSON; FAGÁ, 2007).

Devido à necessidade de aumento da oferta de matéria-prima para a produção de etanol, sem aumentar a área de cultivo e sem influenciar na produção de alimentos, além da preocupação com o despejo de resíduos poluidores, algumas empresas têm investido em pesquisas para o aproveitamento dos materiais lignocelulósicos no processo de obtenção de bioetanol de segunda geração, que utiliza o excedente destes materiais constituídos, sobretudo de polímeros de carboidratos, dentre os quais a celulose é o mais abundante (FURLAN, 2009).

3.2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

A produção de bioetanol de segunda geração ou etanol celulósico é apresentada como uma vantagem em relação às questões ambientais, pois é obtido a partir de açúcares fermentescíveis provenientes da quebra das cadeias de celulose e hemicelulose da biomassa de resíduos industriais, agrícolas e florestais, não competindo, assim, com as áreas cultiváveis utilizadas para a produção de alimentos, uma vez que o produto de interesse já foi extraído. Além disso, podem ser usadas outras culturas que não são utilizadas na alimentação humana. Para isto, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas visando a aumentar a produção deste combustível, aliando sustentabilidade e viabilidade econômica na sua obtenção (OFORI-BOATENG; LEE, 2014).

Em 2014, foram implantadas no Brasil duas indústrias produtoras de etanol de segunda geração (etanol 2G), a GRANBIO, em Alagoas-AL, que utiliza o processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF), e a RAÍZEN, em Piracicaba-SP, que emprega a fermentação por sacarificação e hidrólise separada (SHF). A GRANBIO foi a primeira empresa brasileira a produzir o etanol 2G em escala industrial, utilizando a

tecnologia de uma empresa italiana, a PROESA, na qual o processo é constituído pelas etapas de pré-tratamento por explosão a vapor, hidrólise enzimática e fermentação de pentoses e hexoses. A PROESA assegura que esse produto ainda não possui um preço competitivo à tecnologia de fabricação de etanol de primeira geração (1G), necessitando de melhorias no processo para diminuir os custos operacionais, obtendo, assim, um produto mais barato. Essa empresa declarou, em abril de 2016, a suspensão temporária da produção desse biocombustível devido a problemas na etapa inicial de produção. Essa foi a segunda vez que a usina sofreu uma paralisação alegando que o pré-tratamento é o seu maior problema, no qual a biomassa é tratada para que as enzimas possam utilizar todos os açúcares (KLEINGESINDS, 2017).

O processo necessário para a obtenção do etanol a partir da biomassa lignocelulósica consiste basicamente em quatro fases: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação do produto. O pré-tratamento e a hidrólise são fundamentais para desestruturar a matéria-prima lignocelulósica, que é composta por uma mistura complexa de celulose, hemicelulose e lignina que fazem parte da estrutura dos vegetais, para que assim as fibras celulósicas se tornem acessíveis e possam ser transformadas em açúcares fermentescíveis, que serão utilizados pelas leveduras na fermentação e, conseqüentemente, na produção de etanol (CASCIATORI, 2015; MOREIRA, 2005).

A celulose é constituída por polímeros de hexoses (glicose) e a hemicelulose por polímeros de pentoses (xilose, entre outros) o que os torna atrativos para a extração dos monômeros de açúcares (PEREIRA et al., 2008).

A conversão de hemicelulose em açúcares monoméricos pode ser feita por meio de hidrólise química, como pelo uso de ácidos, ou enzimática, por adição de celulases, que são enzimas responsáveis pela hidrólise de celulose. As hexoses monoméricas (seis átomos de carbono) são fermentadas para o etanol com facilidade, enquanto a fermentação de pentoses (cinco átomos de carbono) é realizada apenas por algumas cepas. Os produtos voláteis produzidos não são facilmente fermentados para etanol. Um problema aparente durante a fermentação é que alguns produtos formados são inibidores para as leveduras ou bactérias que realizam a fermentação. Isso coloca um limite para a concentração de açúcares fermentáveis (MOSIER et al., 2005).

3.3 BIOMASSA CELULÓSICA

A biomassa celulósica é a matéria vegetal formada por meio da fotossíntese e possui átomos de oxigênio na sua composição, diferentemente dos combustíveis fósseis.

A presença desse átomo faz com que a biomassa não necessite de tanto oxigênio do ar, sendo menos poluente (RENDEIRO et al., 2008). A biomassa é a quarta maior fonte de energia, depois do carvão, do petróleo e do gás natural (NIELSEN et al., 2016).

Os resíduos lignocelulósicos, identificados como biomassa, são as fontes biológicas renováveis mais abundantes da natureza, a biomassa é compreendida por resíduos agroindustriais, urbanos e madeira e seus resíduos (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010). Assim, alguns tipos de biomassa são cultivados com a intenção de produção energética, como a cana-de-açúcar, o milho, a beterraba açucareira, os grãos, as algas marinhas, entre outros (DEMIRBAS, 2005a).

Os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura rígida e complexa, formada principalmente por celulose envolta por hemicelulose e lignina, que dificulta a degradação desta biomassa para sua utilização. Portanto, para obter a conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis, é necessária uma etapa de pré-tratamento (ROGALINSKI; INGRAM; BRUNNER, et al., 2008; SCHEUFELE et al., 2012). A Tabela 1 mostra a composição de alguns materiais lignocelulósicos.

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

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

Fonte: SANTOS et al., 2012.

Dos resíduos apresentados na Tabela 1, aqueles provenientes do setor sucroalcooleiro são os mais utilizados para pesquisas no Brasil, pois apresentam vasta disponibilidade. Entretanto, outros tipos de resíduos lignocelulósicos são promissores para a produção de etanol 2G, como, por exemplo, o sabugo de milho que será estudado neste trabalho.

3.4 MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é originário da América Central e pertencente à família das gramíneas. É uma espécie que possui colheita anual e, devido a seu valor nutritivo, é utilizado principalmente na indústria alimentícia, para alimentação humana e para a animal. Se encontra entre as três espécies vegetais mais cultivadas no mundo, depois do arroz e do trigo (MELO, 2010).

Os resíduos do milho, como o sabugo, o colmo (caule), as folhas e a palha, são matérias-primas lignocelulósicas, que apresentam altos percentuais de celulose e

hemicelulose, o que os torna atrativos para a utilização na produção de etanol 2G (MELO, 2010; PRETO; MORTOZA, 2010; MEYER et al., 2013).

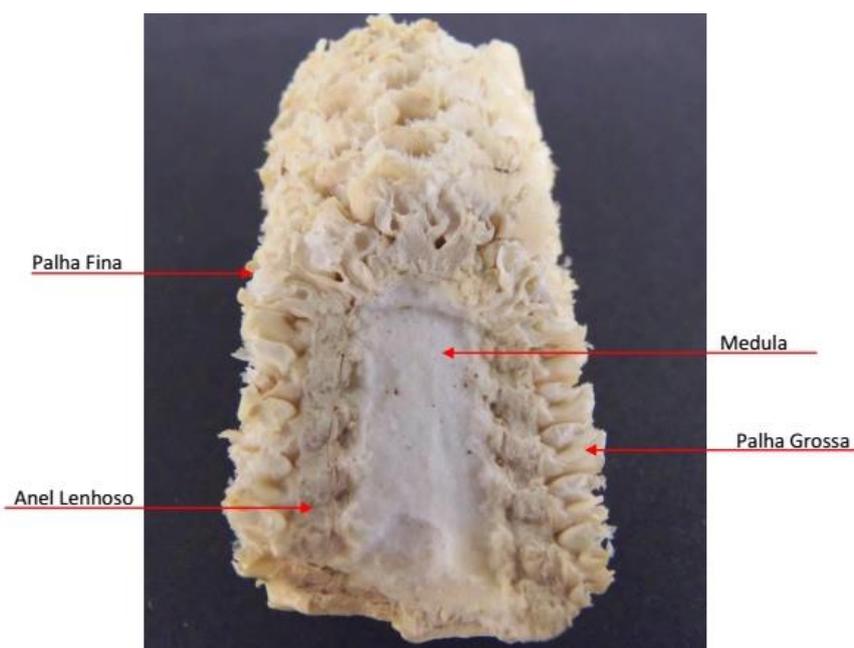
Na safra brasileira de 2014/2015, foi colhido um volume recorde de 85,4 milhões de toneladas de milho (CONAB, 2015). O processamento de 100 kg de espigas de milho gera aproximadamente, 18 kg (70% base úmida) de sabugo, que é despejado na lavoura ou utilizado para ração animal (AGUIAR, 2010).

Dos resíduos do milho, o sabugo localiza-se na parte central das espigas, onde os grãos ficam presos. É o rejeito que se obtém após a espiga ser debulhada para a retirada dos grãos de milho. Em sua composição, apresenta 31,7% de celulose, 34,7% de hemicelulose, 20,3% de lignina e 2,3% de cinzas (KAZIENKO, 2009; AGUIAR, 2010).

A Figura 1 mostra a estrutura do sabugo de milho. Onde, pode-se observar que o sabugo é formado por quatro partes distintas: palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula. A palha fina está na parte externa do sabugo e representa 4,1% de todo seu peso. A palha grossa segue à palha fina e representa 33,7% do peso do sabugo de milho. O anel lenhoso apresenta-se no interior do sabugo com 60,3%, recobrando a medula, que com 1,9% do peso total, é o núcleo central do sabugo (KAZIENKO, 2009; SANTOS, 2010).

A Tabela 2 apresenta as propriedades físicas e químicas do sabugo de milho. Nela pode-se observar que o sabugo apresenta grande concentração de celulose e hemicelulose que podem tornar-se fontes de açúcares fermentescíveis para a geração de etanol celulósico.

Figura 1 – Corte transversal de um sabugo de milho mostrando sua estrutura suas partes constituintes.



Fonte: RAMOS, 2013.

Tabela 2 – Propriedades físicas e químicas do sabugo de milho e sua composição.

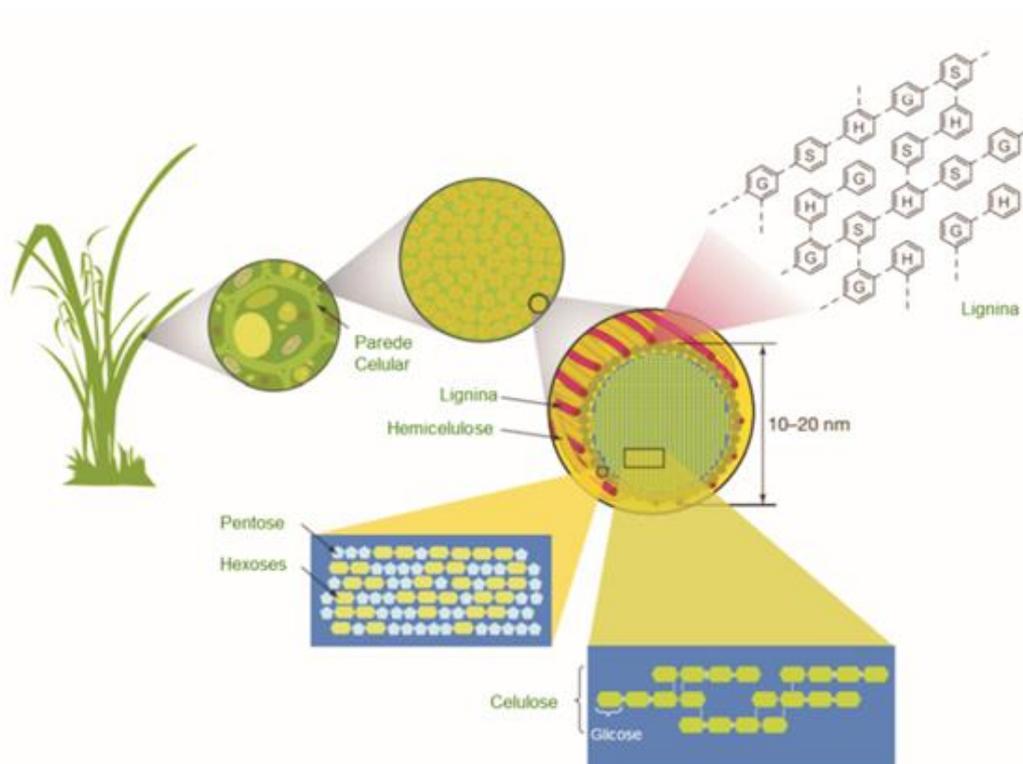
Propriedade	Sabugo inteiro	Anel lenhoso	Medula/Palha
Umidade	9,6%	7,0%	6,0%
Absorção de água	369%	133%	727%
Solubilidade em H ₂ O (100°C)	8,7%	9,5%	7,4%
Solubilidade em H ₂ O (20°C)	6,6%	6,3%	7,1%
Celulose	41,2%	47,1%	35,7%
Hemicelulose	36,0%	37,3%	37,0%
Lignina	6,1%	6,8%	5,4%
Pectina	3,1%	3,2%	3,2%
Amido	0,014%	0,014%	0,015%
pH (superfície)	7,4	7,4	7,4

Fonte: Adaptado de FOLEY; VANDER-HOOVEN, 1981.

3.5 ESTRUTURA LIGNOCELULÓSICA

Os resíduos lignocelulósicos são formados por celulose, hemicelulose e lignina. A estrutura da parede celular de uma biomassa lignocelulósica está apresentada na Figura 2.

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



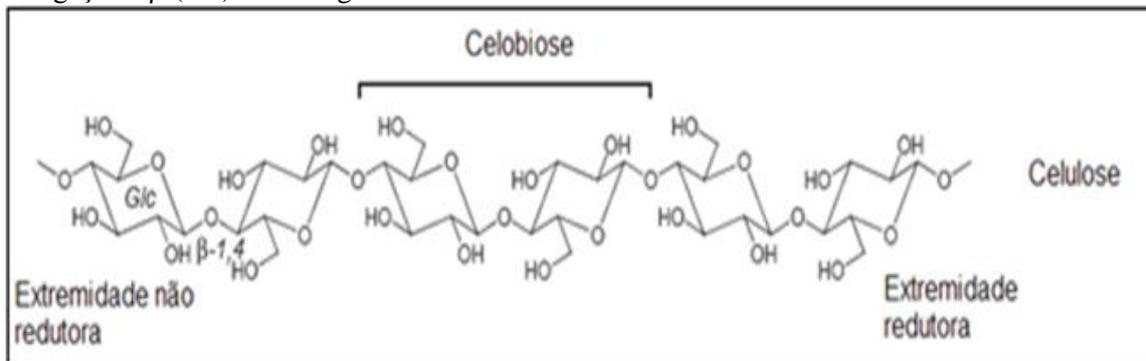
Fonte: RUBIN, 2008.

3.5.1 Celulose

A celulose é a base estrutural das células vegetais, é encontrada na parede celular das plantas, sendo a molécula mais abundante da natureza (PÉREZ; SAMAIN, 2010). Está localizada na parte central da estrutura coberta pela hemicelulose que, por sua vez, está rodeada pela lignina. A celulose é um homopolissacarídeo linear constituído de 8.000 a 14.000 unidades de glicose (na conformação de D-glucopiranosose) unidas por ligações glicosídicas β -(1-4). A condensação de duas moléculas de glicose libera uma molécula de água formando a celobiose (ALBANO, 2012). A análise conformacional da celulose apresenta a celobiose (4-O- β -D-glucopiranosil- β -D-

glucopirranose) como sua unidade básica (RAMOS, 2003). A Figura 3 mostra a representação das principais ligações entre os constituintes da celulose.

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



Fonte: SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005.

As cadeias de celulose são unidas entre si, formando microfibrilas, que são estabilizadas por ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, as ligações conferem à estrutura alta rigidez, tornando a macromolécula cristalina e difícil de ser hidrolisada. As regiões cristalinas são estruturas organizadas e são responsáveis pela insolubilidade e pouca reatividade da celulose. Regiões amorfas, que apresentam uma estrutura não organizada, compreendem uma pequena parte da celulose nativa e alternam-se com regiões cristalinas (LEMOS, 2001; FENGEL; WEGENER, 1989).

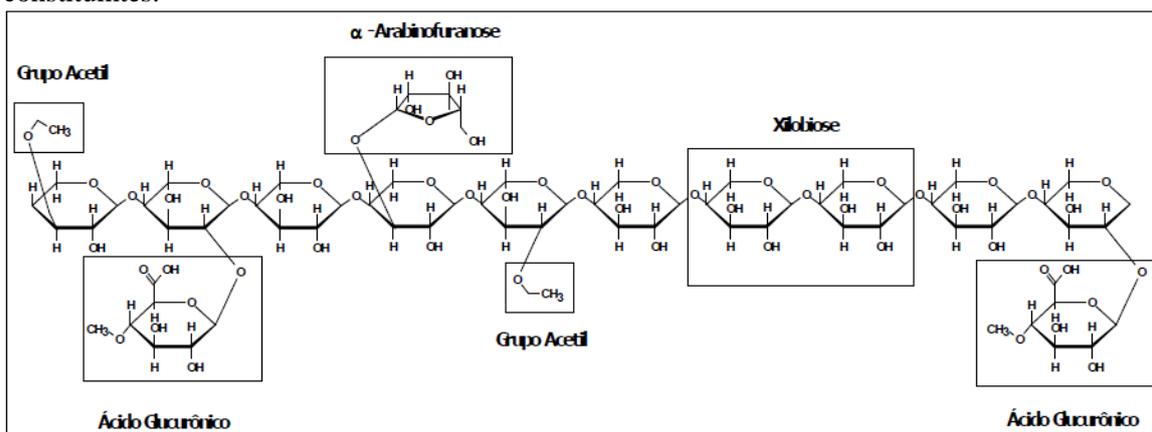
A celulose apresenta resistência à hidrólise devido às estruturas cristalinas em algumas regiões nas plantas, e devido às barreiras físicas e fortes interações intermoleculares criadas pela hemicelulose e pela lignina presentes nessa biomassa lignocelulósica. Essa resistência é uma das maiores dificuldades para a conversão biotecnológica da celulose em sacarídeos. No entanto, algumas regiões amorfas, ou não cristalinas, podem ser encontradas na celulose, sendo mais suscetíveis à hidrólise. A celulose não apresenta água na estrutura da microfibrila, assim, a celulose é a última a ser atingida durante a hidrólise. Quando a celulose é hidrolisada em condições brandas resulta na sua unidade básica, a celobiose (BETANCUR, 2005; AGUILAR et al., 2002; SUN; CHENG, 2002).

A degradação da celulose em glicose é realizada por enzimas específicas, as celulases, produzidas por microrganismos diversos. As celulases hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis de baixo grau de polimerização (menor que 7), sendo a glicose o principal destes (SILVA, 2010).

3.5.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante na natureza, após a celulose, é composta por cadeias de 100 e 200 unidades de pentoses (xilose, ramnose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose). Diferentemente da celulose, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos, muitas vezes são ramificadas, possuem baixo grau de polimerização, sendo assim, fáceis de hidrolisar. As principais hemiceluloses de madeira macia são O-acetil-galactoglucomannans e arabino-4- O-metilglucurono-D-xilanos, enquanto que em feixes de madeira os O-acetil-4-O-metilglucurono-D-xilanos são os mais relevantes (FENGEL; WEGENER, 1989). A hidrólise da espinha dorsal da hemicelulose leva à formação de pentoses (predominantes em folhosas e em plantas anuais), hexoses (principalmente em madeiras macias) e ácidos urônicos (MARTÍNEZ et al., 2005). A estrutura do polímero de hemicelulose está representado na Figura 4.

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



Fonte: MUSSATTO et al., 2010.

A hemicelulose consiste de uma estrutura complexa de carboidratos, nas plantas, ela faz a conexão entre fibras de lignina e as fibras de celulose, proporcionando maior rigidez à celulose-hemicelulose-lignina (MUSSATTO et al., 2010). Apresenta um peso molecular mais baixo do que a celulose. É composta por ramos com cadeias laterais curtas que são formados por diferentes açúcares, que são polímeros facilmente degradáveis. A hemicelulose é o componente mais termoquimicamente sensível que faz parte da lignocelulose (FENGEL AND WEGENER, 1984; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A macromolécula da hemicelulose é formada por um elevado grau de ramificações, não apresentando, portanto, regiões cristalinas. É constituída em sua

maior parte por uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, como as xilanas, as arabinanas e as mananas, mas a macromolécula da hemicelulose apresenta também polissacarídeos mais complexos como arabinoxilanas, glucoarabinoxilanas, arabinogalactanas, arabinoglucouranoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas, galactoglucomananas e galactomananas (MARTÍNEZ et al., 2005).

A xilana é o polissacarídeo mais abundante da estrutura hemicelulósica, sendo, assim, o principal polissacarídeo encontrado na hemicelulose. É o segundo polissacarídeo mais encontrado nos vegetais, estando entre as três principais fontes de carbono orgânico renovável. A xilana apresenta uma estrutura linear composta por unidades de xilose unidas por ligações glicosídicas β -1,4, contendo ramificações de pentoses e hexoses (BEG et al., 2001; KATAPODIS et al., 2006).

O componente dominante das hemiceluloses é o xilano em madeiras, em plantas e em gramas agrícolas, enquanto o glucomanano em madeiras macias. As hemiceluloses reduzem o tamanho médio dos poros da biomassa e, portanto, reduzem a acessibilidade da celulose às enzimas hidrolíticas. O xilano da hemicelulose pode ser extraído em um ambiente ácido ou alcalino, enquanto o glucomanano é dificilmente extraído em um ambiente ácido e precisa de um ambiente alcalino mais forte que o xilano (KOHNE, 2010). Além disso, os parâmetros de degradação devem ser cuidadosamente otimizados para evitar a formação de produtos de degradação de hemicelulose, como furfurais e hidroximetilfurfurais (HMF) que inibem o processo de fermentação (KARLSSON et al., 2012).

3.5.3 Lignina

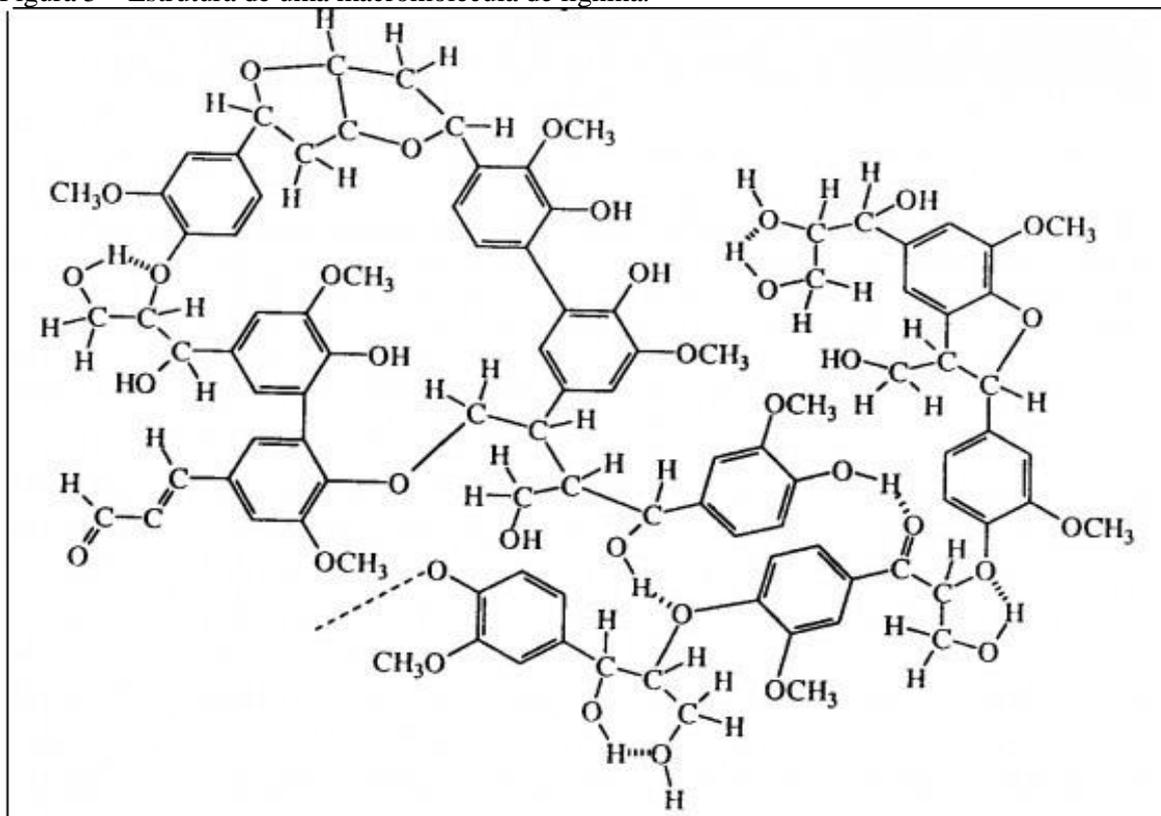
A lignina é formada por múltiplos polímeros aromáticos naturais, compostos por fenilpropano, e é encontrada em grande abundância na natureza. É o componente responsável pela estrutura rígida da parede celular das plantas. Ela é encontrada nas plantas ligada covalentemente com à xilana presente na hemicelulose por meio de ligações tipo éster formando assim uma estrutura complexa que envolve a hemicelulose e as microfibrilas da celulose (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

A lignina de madeira macia é composta predominantemente por unidades de guaiacil. A lignina de madeira dura também apresenta quantidades importantes de unidades de guaiacil, porém, contém principalmente unidades de siringil. Além das unidades de guaiacil e, as ligninas de plantas anuais também possuem unidades de p-

hidroxifenilo. As unidades fenilpropanóides estão ligadas através de uma rede complexa de ligações éter e carbono-carbono (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

A lignina tem a função de prover rigidez aos tecidos das plantas e prevenir o colapso dos elementos que conduzem água e, também previne o ataque à parede celular das plantas por microrganismos celulolíticos. A lignina liga os componentes da parede celular, proporcionando a biomassa lignocelulósica sua integridade estrutural (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005). A estrutura da lignina é apresentada na Figura 5.

Figura 5 – Estrutura de uma macromolécula de lignina.



Fonte: CARVALHO, 2005.

Para que a hemicelulose e a celulose possam liberar açúcares é necessária uma etapa de pré-tratamento para fragmentar a estrutura cristalina da lignocelulose a fim de remover a lignina, pois, a maior dificuldade para o aproveitamento dos materiais lignocelulósicos está representada pela barreira física formada pela lignina. Desta forma, as moléculas de celulose e hemicelulose são expostas e podem ser submetidas à ação de enzimas ou hidrólise (DURÁN et al., 1998; OGEDA; PETRI, 2010). Entretanto, os compostos que derivam da lignina na hidrólise, quando liberados, podem

dificultar os processos fermentativos, pois os furfurais e outros compostos que constituem a lignina são inibidores da fermentação (LEMOS, 2001).

3.6 HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

3.6.1 Pré-tratamento

Os resíduos lignocelulósicos são compostos por celulose, hemicelulose e lignina, e apresentam uma estrutura complexa e rígida que dificulta a utilização da celulose como fonte de carbono para produção de bioetanol. Para isso, é preciso utilizar um método de pré-tratamento, que apresenta o objetivo de reduzir o grau de cristalinidade da celulose e desestabilizar a estrutura lignocelulósica para que essa possa ser hidrolisada ou removida, facilitando o acesso de reagentes, catalisadores e enzimas à estrutura da celulose e, conseqüentemente, aos carboidratos fermentescíveis (OLIVEIRA; NETO, 2011). Isto é alcançado pela remoção de lignina e hemicelulose, fatores que afetam a disponibilidade de celulose para a degradação microbiana (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

Os pré-tratamentos para uso dos substratos lignocelulósicos são originários da ciência que estuda a utilização da madeira, principalmente na fabricação de papel e celulose, mas também, inicialmente foram utilizados na agricultura para aumentar a digestibilidade dos resíduos que serviam como alimento para os ruminantes. Um desses pré-tratamentos data de 1819, quando o químico e farmacêutico francês Henri Braconnot descobriu que, ao tratar madeira com ácido sulfúrico concentrado, obtinha-se glicose (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

Desde então, vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos para se utilizar na degradação do complexo lignocelulósico, constituído por uma matriz de celulose e lignina ligada por cadeias de hemicelulose. Os métodos propostos podem ser químicos, físicos, físico-químicos e biológicos, ou uma combinação destes, visando à liberação dos açúcares fermentescíveis presentes nos resíduos lignocelulósicos. Dentre estes métodos, os pré-tratamentos químicos são as técnicas mais pesquisadas e têm sido amplamente utilizados na deslignificação dos materiais celulósicos, pois, removem a lignina sem degradar a cadeia celulósica. Nestes materiais, a lignina está fortemente ligada à hemicelulose, ocorrendo, assim, uma degradação parcial da hemicelulose no processo de pré-tratamento químico (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; HIMMEL et al., 2007; SUN; CHENG, 2002; MOSIER et al., 2005).

3.6.2 Pré-tratamento físico

A primeira etapa necessária para a produção de etanol a partir de resíduos agrícolas é a desintegração da estrutura dos resíduos por meio de moagem ou trituração, com a finalidade de aumentar a área de superfície disponível e o tamanho dos poros dos materiais lignocelulósicos, para diminuir a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose (SUN; CHENG, 2002; HARMSSEN et al., 2010).

Diferentes tipos de moagem são utilizados para reduzir o tamanho dos resíduos, como o uso de moinho de bolas, moinho de dois rolos, moinho de martelos, moinho coloidal e moagem de vibração, também podem ser usados irradiação, raios gama e feixe de elétrons, para melhorar a digestibilidade enzimática de resíduos lignocelulósicos (ZHU et al., 2009; ZHU, 2011).

Um tamanho de partícula muito fino pode não ser favorável e pode impor efeitos negativos sobre o processamento subsequente, como pré-tratamento e hidrólise enzimática. Pode gerar aglomerados durante as etapas seguintes envolvendo líquido e pode levar à canalização. Assim, o gasto de energia para que a moagem seja feita aumenta (TALEBNIA et al., 2010).

A redução de tamanho é um dos métodos mais eficazes para aumentar a acessibilidade das enzimas à lignocelulose, porém, o gasto de energia para a fragmentação dos materiais agrícolas utilizando métodos mecânicos depende do tamanho inicial e final das partículas, do teor de umidade e da natureza dos resíduos (madeira dura, madeira macia, fibrosa, etc.) que estão sendo manipulados (SUN; CHENG, 2002; TALEBNIA et al., 2010).

Portanto, tendo em conta as exigências de alta energia da moagem em escala industrial e o aumento das demandas de energia, é improvável que a moagem ainda seja economicamente viável (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Nesse contexto, a extrusão é um método de pré-tratamento físico inovador e promissor para a conversão de biomassa para a produção de biocombustíveis. Na extrusão, os materiais são submetidos a calor, mistura e cisalhamento, o que resulta em modificações físicas e químicas na biomassa após a passagem pela extrusora. A extrusão possui muitas vantagens, como a capacidade de proporcionar alto cisalhamento, transferência de calor rápida e homogeneização (KARUNANITHY; MUTHUKUMARAPPAN, 2010).

O aumento da área superficial específica, a redução do grau de polimerização e o cisalhamento são todos fatores que aumentam o rendimento de hidrólise total da

lignocelulose na maioria dos casos em 5 a 25%, depende do tipo de biomassa, tipo de moagem e tempo de moagem, mas também reduz a duração de digestão técnica entre 23 a 59%, portanto, um aumento na taxa de hidrólise (DELGENÉS et al., 2002, HARTMANN et al., 1999).

3.6.3 Pré-tratamento térmico

Neste pré-tratamento o aquecimento é usado para desestruturar a biomassa lignocelulósica. Temperaturas acima de 150 °C fazem com que, primeiramente, as hemiceluloses, seguida da lignina comecem a solubilizar (BOBLETER, 1994; GARROTE et al., 1999).

A estrutura e os grupos de ramificação presentes no esqueleto da hemicelulose determinam a sua estabilidade térmica, ácida e alcalina. Os xilanos, um dos componentes de maior importância da hemicelulose são termicamente menos estáveis, mas a diferença com os glucomanos, outro componente principal da estrutura da hemicelulose, é pequena. Em temperaturas acima de 180 °C, uma reação exotérmica começa, iniciando a solubilização da hemicelulose e da lignina (FENGEL; WEGENER, 1984; HON; SHIRASHI, 1991).

O pré-tratamento térmico provoca a formação de compostos solúveis de hemicelulose e lignina, com o risco de formação na maioria das vezes de compostos fenólicos heterocíclicos como a vanilina, o álcool de vanilina, o furfural e o HMF, principalmente em ambiente ácidos. Em muitos casos, estes compostos formados apresentam um efeito inibitório ou tóxico sobre microrganismos (RAMOS, 2003).

3.6.4 Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico é um dos métodos mais usados para aumentar a biodegradabilidade, o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose pela remoção da hemicelulose e da lignina (MTUI, 2009; AGBOR et al., 2011).

A hidrólise química pode ser à base de ácido, álcali, aplicação de ozônio, organo-solventes e deslignificação oxidativa. Dessas, a hidrólise ácida e a hidrólise alcalina podem ser empregadas como hidrólise e pré-tratamento separadamente ou em conjunto com uma hidrólise biológica, como a hidrólise enzimática (SUN; CHENG, 2002).

Estes métodos são amplamente estudados na indústria de celulose e papel para ser utilizado na deslignificação de material celulósico (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). Também foi explorado para aumentar a digestibilidade da biomassa em um processo de pré-tratamento industrial (WYMAN et al., 2005).

3.7 HIDRÓLISE ÁCIDA

A hidrólise ácida é um dos métodos de pré-tratamento mais promissores em relação à prática industrial. O pré-tratamento ácido da biomassa é utilizado tanto para hidrolisar a hemicelulose e a celulose, quanto para realizar um tratamento inicial para facilitar uma posterior hidrólise enzimática desses polímeros em hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) (ALZATE; TORO, 2006).

Durante o pré-tratamento ácido ocorre uma reação de hidrólise da fração hemicelulósica, especialmente das xilanas e glucanas, aumentando a digestibilidade da celulose. A hemicelulose pode ser degradada em xilose, manose, ácido acético, galactose, glicose, etc. (MOSIER et al., 2005; CHIARAMONTI et al., 2012).

O principal objetivo da hidrólise ácida é tornar a celulose acessível aos reagentes por meio da solubilização e hidrólise da fração hemicelulósica da biomassa, resultando em alta recuperação dos açúcares fermentescíveis no líquido de pré-tratamento e em uma fração de celulose sólida com alta taxa de convertibilidade enzimática (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

O procedimento deste pré-tratamento pode ser realizado com a utilização de ácidos diluídos ou concentrados. Contudo, a utilização do ácido concentrado gera a formação de maior número de compostos inibidores de degradação de carbono, tornando-se menos atrativo para o processo de produção de etanol (ALVIRA et al., 2010).

Já o pré-tratamento com ácido diluído (geralmente entre 0,2% e 2,5% p/p) é o processo mais eficaz para os materiais lignocelulósicos, onde, a estrutura base da celulose não é afetada, o que gera menos produtos de degradação do que os pré-tratamentos com ácido concentrado. Esse atributo do processo resulta em hidrolisados com alto conteúdo de xilose, em relação a outros glicídios (WYMAN et al., 2005; CARDONA; QUINTEIRO, 2009).

No decorrer da hidrólise ácida, os catalisadores liberam prótons que degradam as ligações heterocíclicas de éter entre os monômeros das cadeias poliméricas da hemicelulose e da celulose. A clivagem dos polímeros resulta em diversas substâncias,

em maior parte xilose, glicose e arabinose (RODRIGUEZ-CHONG et al.,2004; SUN; CHENG, 2002).

Dependendo das condições utilizadas no pré-tratamento, poderá ocorrer a formação de produtos de degradação, como o ácido acético e o furfural, pela degradação de pentoses, e o hidroximetilfurfural (HMF), pela degradação das hexoses. Esses componentes podem influenciar negativamente a etapa da fermentação, pois, são inibidores do crescimento de microrganismos, portanto devem ser evitados ou removidos por meio de desintoxicação (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000). Além de serem inibitórios, esses compostos provocam corrosão de equipamentos, apresentam natureza tóxica e causam aumentos nos custos operacionais e de manutenção tornando esse pré-tratamento menos atraente (ARENAS et al., 2010; ROMERO et al., 2010).

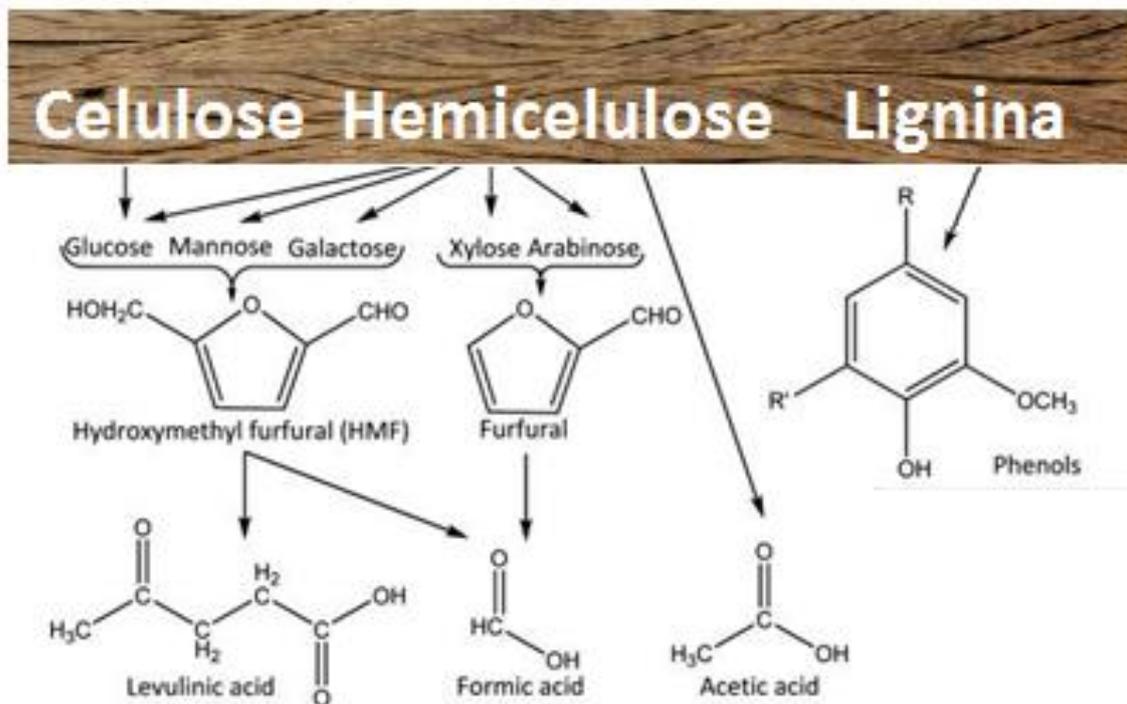
Dentre os ácidos utilizados para esse tipo de pré-tratamento, o ácido sulfúrico é amplamente utilizado, entre outros encontram-se: ácido clorídrico, ácido fluorídrico, ácido acético, ácido nítrico e ácido fosfórico (CARDONA; QUINTERO, 2009; RODRIGUEZ-CHONG et al.,2004; SUN; CHENG, 2002).

3.8 FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS

O objetivo do pré-tratamento da biomassa é alcançar altos graus de solubilização da hemicelulose e da lignina. No entanto, a geração de subprodutos também acontece, a maior parte dos compostos que são inibidores de fermentação se formam durante o pré-tratamento quando a hemicelulose e a lignina são solubilizadas e degradadas (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). A quantidade e a natureza dos produtos de degradação formados, muitos dos quais são inibitórios para os processos biocatalíticos, estão diretamente relacionados ao método e condições de pré-tratamento (WANG, et al., 2013).

A partir da degradação de um polímero lignocelulósico, a lignina permanecerá como um resíduo sólido, em que uma parte menor foi degradada em compostos fenólicos e outros compostos aromáticos, que são considerados inibidores da fermentação (JÖNSSON et al., 2013). As principais vias de formação desses compostos inibidores estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6 – Representação das vias de formação de açúcares fermentescíveis e de compostos inibidores durante o tratamento ácido utilizado para degradar materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de JÖNSSON et al., 2013.

Quando em altas temperaturas e pressões, a glicose, a manose, a galactose, a xilose e a arabinose, obtidas durante a hidrólise da hemicelulose e a glicose, obtida da celulose, podem ser degradadas em HMF e furfural e, quando esses compostos são clivados, geram ácidos carboxílicos. Os compostos fenólicos são formados a partir da degradação parcial da lignina; a concentração ácida, o tempo e a temperatura de fermentação influenciam, portanto, a formação de compostos inibidores (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Durante a utilização de um pré-tratamento ácido para degradar materiais lignocelulósicos, além de se obter açúcares fermentescíveis a partir da hemicelulose e da celulose há a formação de subprodutos de degradação de açúcares e da lignina, esses subprodutos são compostos que inibem o metabolismo dos microrganismos e a fermentação, pois são tóxicos para as leveduras e bactérias utilizadas na fermentação. Os compostos que serão formados ou liberados são ácidos carboxílicos (ácido fórmico, ácido acético e ácido levulínico) e derivados de furano (furfural e HMF) (CHANDEL et al., 2007; JÖNSSON et al., 2013).

3.8.1 Ácidos Carboxílicos

Nos hidrolisados de materiais lignocelulósicos são liberados ácidos carboxílicos, tais como os ácidos: acético, levulínico e fórmico. Estes ácidos são formados devido à hidrólise dos grupos acetil ligados ao açúcar ou a outra ligação presente no esqueleto hemicelulósico (XING; QI; HUBER, 2011). O ácido acético é gerado pela hidrólise dos grupos acetil presentes na hemicelulose, enquanto o ácido levulínico e fórmico são formados como produtos de degradação dos polissacarídeos catalisados por ácidos termoquímicos (JÖNSSON et al., 2013).

Esses ácidos são lipossolúveis e podem difundir-se através da membrana plasmática da célula reduzindo o pH intracelular e assim, dificultando a produção de energia e o transporte de nutrientes, aumentando a necessidade energética da célula. O ácido acético presente no meio de fermentação provoca queda na produtividade, no rendimento e no consumo de açúcar (TOSETTO, 2008). A forma não dissociada do ácido acético afeta mais os microrganismos do que a forma dissociada, devido ao fato de que, os ácidos carboxílicos não dissociados se difundem através da membrana celular microbiana, dissociam e diminuem o pH interno (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

Quando o pH extracelular é inferior ao pKa do ácido (constante de dissociação logarítmica do ácido) pode haver um estresse ácido na célula, pois, se o pH for menor que o pKa significa que há formas não dissociadas do ácido em abundância que podem difundir-se para dentro da célula, onde a dissociação de ácido resulta em um acúmulo de prótons, causando a acidificação intracelular. Essa acidificação inibe o crescimento das células e a formação de subprodutos, afetando o metabolismo celular. Contudo, essa diminuição do pH resulta em um acúmulo de ânions no interior das células, que causa a degradação de vacúolos. Se o pH é maior que o pKa, significa que fora da célula tem-se grande quantidade de ácido dissociado, e isso é inofensivo quando comparado com a forma não dissociada do ácido. A produção de etanol é inibida a um pH igual ou menor do que o pKa 4,8 do ácido acético (NUGROHO; YOSHIKA; SHIMIZU, 2015).

3.8.2 Derivados de Furanos

Os aldeídos derivados de furanos, furfural e HMF são compostos reativos encontrados normalmente em hidrolisados lignocelulósicos, e são gerados pela degradação de pentoses e hexoses durante o processo de hidrólise. Ambos os compostos reduzem a atividade enzimática e biológica, quebram o DNA, inibindo a síntese de

RNA e proteínas dos microrganismos, o que reduz a produtividade de etanol (ALMEIDA et al., 2007; CHANDEL et al., 2007; JÖNSSON et al., 2013).

O furfural é um aldeído de natureza aromática, formado pela hidrólise de materiais lignocelulósicos que contêm pentoses (GUTIÉRREZ-RIVERA et al., 2012). É formado facilmente em processos que utilizam alta temperatura, além de possuir maior toxicidade em fermentação com etanol do que outros inibidores (GUO et al., 2008). Esse tipo de substância reduz o crescimento celular, a formação de ATP e a produção de etanol. Dependendo do tipo de microrganismo, pode haver a morte da célula ao interferir na respiração e na fosforização oxidativa (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

O estudo da atividade *in vitro* de várias enzimas de destaque no catabolismo do carbono primário, como hexoquinase, aldolase, fosfatofruitoquinase, triosefosfato desidrogenase e álcool desidrogenase, mostrou que o furfural era o composto mais inibitório. Entre essas enzimas, triosefosfato e álcool desidrogenases foram consideradas as mais sensíveis ao furfural. No entanto, a inibição de certas enzimas não glicolíticas, como piruvato e aldeído desidrogenases é ainda mais acentuado (MODIG; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002). Portanto, o crescimento celular é mais sensível na presença de furfural do que a produção do etanol pelo microrganismo. Em alguns casos, também foi revelado que o furfural é convertido em menos compostos inibitórios, álcool furfúrico e ácido furóico por algumas espécies de microrganismos fermentadores (GORSICH et al., 2006).

O hidroximetilfurfural (HMF) é gerado pela degradação de hexoses e apresenta um mecanismo de ação similar ao do furfural, porém, formado não tão facilmente quanto o furfural em altas temperaturas (GUO et al., 2008). Além disso, o HMF é assimilado em taxas menores, tendo o efeito de aumentar a fase lag de crescimento das células (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

O HMF é menos tóxico na natureza, quando em comparação com o furfural. Isto está de acordo com a observação de que na inibição *in vitro* das enzimas, como piruvato e aldeído desidrogenases, o HMF se mostrou menos inibitório do que o furfural. Entretanto, também foi relatado que o HMF aumenta a fase lag (fase de adaptação ao meio) e diminui o crescimento celular (MAKAWI et al., 2009). No entanto, a taxa de conversão de furfural foi aproximadamente 4 vezes mais rápida do que de HMF. Portanto, o HMF permanece muito mais tempo do que o furfural no meio e, conseqüentemente, o HMF faz o processo microbiano durar mais do que o de furfural (ASK et al., 2013).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode converter o furfural em álcool furfurílico, em condições anaeróbias, e HMF em 2,5-bis-hidroximetilfurano (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000). Utilizando esta mesma levedura, Wang et al. (2013), realizaram uma adequação com transferências sequenciais para melhorar o desempenho de uma estirpe industrial de *S. cerevisiae* na presença de altas concentrações de inibidores. O resultado indicou que a cepa tolerante pôde degradar rapidamente o furfural e HMF, resultando em um aumento da produtividade de etanol e na taxa de consumo de glicose.

3.8.3 Compostos Fenólicos

Durante a etapa de pré-tratamento de um material lignocelulósico, os compostos fenólicos são formados com a degradação da lignina. Alguns exemplos de compostos fenólicos são: siringaldeído, ácido 4-hidroxibenzaldeído e 4-hidroxibenzóico e os ácidos salicílico, vanílico, siríngico, gentísico, entre outros. No entanto, os compostos aromáticos, como, ácido benzoico e ácido cinâmico (MITCHELL et al., 2014) também podem ser formados como resultado da degradação do açúcar e são encontrados em lignocelulose como substâncias voláteis (SUN, 2008).

Esses compostos podem reagir com moléculas biológicas da célula (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) ou provocar danos à membrana celular, gerando perda da seletividade e integridade da membrana, e, portanto, afetam sua capacidade como barreiras seletivas, como matrizes enzimáticas, diminuem o crescimento celular e a suplementação de açúcares (CAMPOS et al., 2009). E ainda inibem as enzimas glicolíticas e fermentativas no processo de fermentação alcoólica. Portanto, esses compostos causam efeitos negativos na fermentação por meio da diminuição da taxa específica de crescimento do microrganismo e da redução da produtividade de etanol (ROSSELL, 2006).

Os compostos fenólicos de alto peso molecular são menos inibitórios que os compostos de baixo peso molecular. Além disso, a toxicidade desses compostos é influenciada pela posição do substituinte no grupo funcional dos compostos fenólicos (NOGUEIRA et al., 2008).

Em meio aos compostos fenólicos, o siringaldeído e o ácido vanílico afetam o crescimento celular e o metabolismo fermentativo etanólico de vários microrganismos, como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *S. cerevisiae* (CHANDEL et al., 2011).

3.8.4 Outros Compostos Inibitórios

O etanol obtido durante uma fermentação pode inibir o crescimento, a viabilidade, os sistemas de transporte da glicose e o fluxo de prótons em *S. cerevisiae*. A membrana plasmática desta levedura é comprometida no que diz respeito à organização, à permeabilidade e à composição lipídica. No entanto, *S. cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* são microrganismos etanologênicos e podem tolerar concentrações elevadas de etanol, mais de 18% e 12%, respectivamente (HIRASAWA et al., 2010; JÖNSSON et al., 2013).

Em alguns materiais lignocelulósicos há a presença de íons orgânicos, cuja a formação acontece em algumas hidrolises a partir de produtos químicos adicionados no pré-tratamento, no condicionamento e na hidrólise ou com a utilização dos equipamentos do processo. Esses íons, que podem estar presentes devido à adição de sais, elevam a pressão osmótica gerando efeitos inibitórios. A levedura *S. cerevisiae* é relativamente tolerante ao sal quando comparada com outras leveduras, como *Schizosaccharomyces pombe* e *Pichia stipitis*, mas é menos tolerante do que *Candida* sp. em meio à base de glicose, *S. cerevisiae* se desenvolve em uma solução de cloreto de sódio a 1,5 M. No entanto, um fator mais relevante do que a concentração absoluta de sódio é a relação intracelular de Na^+/K^+ , que deve ser mantida baixa (WADSKOG; ADLER, 2003).

Outros compostos inibitórios que podem se formar por meio de pré-tratamentos ácidos incluem quinonas e pequenos aldeídos alifáticos. Os compostos como benzoquinonas são fortemente inibitórios para leveduras. A inclusão de 20 mg/L de benzoquinona em experimentos de fermentação com *S. cerevisiae* foi suficiente para inibir completamente o crescimento e a formação de etanol (LARSSON et al., 2001).

O processo de fermentação pode ser melhorado se os inibidores presentes forem identificados. A formação de inibidores pode diminuir devido à otimização do pré-tratamento e da hidrólise. Diferentes processos de desintoxicação específicos podem ser desenvolvidos para a remoção eficiente de inibidores antes de se proceder à fermentação. Os métodos para desintoxicação do hidrolisado variam de acordo com o tipo de inibidor presente. Entre os mais conhecidos encontram-se: mudanças de pH com óxido de cálcio, hidróxido de cálcio e ácido sulfúrico; utilização de carvão ativado, colunas de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, evaporação, peneiras moleculares e até aplicação de enzimas (YADAV et al., 2011).

3.9 DESINTOXICAÇÃO

Durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos são liberados açúcares polimerizados que são fermentados em etanol por microrganismos, como por exemplo, a *S. cerevisiae*. Além desses açúcares, compostos inibidores são liberados ou formados na etapa de pré-hidrólise. Essas substâncias formadas limitam a produção de etanol, e por isso, são desenvolvidos métodos específicos de desintoxicação do material hidrolisado, para posterior processo de fermentação (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

A desintoxicação tem grande importância no processo, pois é necessário que se tenha baixo teor de compostos fenólicos para que a fermentação ocorra com eficiência. Existe uma variedade de métodos químicos, biológicos e físicos que podem ser empregados para desintoxicar lamas e hidrolisados (PARAWIRA; TEKERE, 2011).

Dentre os procedimentos que foram pesquisados estão inclusos supercalagem ou *overliming* (tratamento com hidróxido de cálcio), um dos métodos mais eficientes; tratamentos com outros produtos químicos, tratamentos enzimáticos, uso de aquecimento e vaporização, extração líquido-líquido, extração líquido-sólido, como o uso de carvão ativado, e tratamentos com biocatalisadores microbianos, apresentados na Tabela 3. Pesquisas comparando esses diferentes métodos informam que eles diferem significativamente em relação aos efeitos sobre a química do hidrolisado e sobre a fermentação, e também mostram que um dos métodos mais eficientes é o *overliming*, devido à precipitação eficiente das substâncias tóxicas, que, em muitos casos, se apresenta como o método mais econômico (CANTARELLA, 2004; JÖNSSON et al., 2013).

Tabela 3 – Métodos que podem ser utilizados na desintoxicação de hidrolisados lignocelulósicos.

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

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

Outro método que apresenta vantagens em sua utilização é o uso do procedimento químico com adição de carvão ativado em hidrolisados para reduzir inibidores e diminuir o tempo de fermentação. O carvão ativado é um material poroso de origem vegetal, cujo tratamento é baseado na elevada capacidade que esse material tem de adsorver diferentes tipos de moléculas que ficam presas em sua superfície devido a interações físicas fracas chamadas de Van der Waals (CARVALHO, 2005; KIM et al., 2013).

O carvão vegetal é produzido a partir de madeiras tratadas em temperaturas superiores a 600°C e tem se apresentado muito eficiente, pois é capaz de aumentar a fermentação dos hidrolisados devido à uma eliminação seletiva dos compostos tóxicos sem afetar a concentração de açúcares fermentáveis (LEE, 1997).

3.10 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

O processo fermentativo que ocorre para produção de etanol pode ser realizado por bactérias ou leveduras que metabolizam e convertem açúcares como glicose, frutose, manose, xilose e arabinose em álcool (ROSSI et al., 2014).

Os microrganismos mais usados na obtenção de etanol são as leveduras, e dentre estas a mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae* (LIN; TANAKA, 2006). Além disso, outras leveduras são utilizadas, como: *Candida* sp., *Pichia* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp. e *Pachysolen* sp.; fungos filamentosos: *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Monilia* sp. e *Paecilomyces* sp.; e bactérias: *Clostridium* sp., *Bacillus* sp., *Thermoanaerobacter* sp., *Klebsiella* sp. e *Zymomonas mobilis* (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

A *S. 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 e a 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 (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000; LIMA et al., 2001).

Essa levedura é tradicionalmente utilizada devido à sua alta produção e sua resistência ao etanol, o que mantém um baixo custo na destilação em usinas. Também é tolerante a baixos valores de pH e oxigênio e altas concentrações de açúcares (LIMA et al., 2001; NEIVOIGT, 2008).

Linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* são largamente empregadas pelo campo sucro-energético brasileiro por possuírem uma combinação de elevada eficiência fermentativa com prolongada persistência na safra. Muitas destas linhagens começaram a ser comercializadas desde o fim da década de 1990 (BASSO et al., 2008).

Porém, a levedura *S. cerevisiae* não apresenta a capacidade de assimilar xilose, presente na biomassa para produção de etanol, pois não apresenta as enzimas necessárias para a conversão de xilose da biomassa em etanol. Entretanto, existem cepas

geneticamente modificadas capazes de produzir etanol a partir de xilose (ZHANG et al., 2016).

Ainda que a levedura não converta xilose em etanol, ela é considerada um microrganismo vantajoso para a fabricação de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos. Dentre essas vantagens, destaca-se a tolerância da levedura aos compostos formados durante a fermentação, que podem causar inibição a alguns microrganismos e à capacidade de suportar concentrações mais elevadas de etanol; enquanto a maioria das leveduras fermentativas deixam de crescer ou de fermentar a partir de 6% (v/v), a *S. cerevisiae* produz concentrações de etanol de 17% (v/v) ou superior (SANTOS et al., 2010).

O desenvolvimento, a produção de massa celular e a produção de metabólitos de interesse dos microrganismos normalmente são influenciados por alguns fatores ambientais, físico, químicos e biológicos, que interferem no crescimento ou no rendimento da fermentação e na produção dos metabólitos, como o etanol. Em geral, a diminuição na eficiência fermentativa resulta em alterações no equilíbrio dinâmico, e pode ocorrer devido a diversos fatores físicos, como, por exemplo, temperatura, pressão osmótica; fatores químicos como, pH, oxigenação do meio, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores; e fatores microbiológicos como a espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação microbiana; que afetam a eficiência da conversão de açúcar em etanol (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

Em pesquisas realizadas na Universidade de Coimbra (em Portugal), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 foi avaliada em lamas primárias residuais da indústria papelreira portuguesa, onde, estes resíduos são compostos por fibras lignocelulósicas com alto teor de carboidratos, que podem ser convertidos a produtos como por exemplo o bioetanol. A levedura foi testada *in natura* e apresentou como características boa produção de etanol e facilidade de adaptação a temperaturas de crescimento maiores do que a ótima de 30 °C. Além de encontrar uma melhor utilização para estas lamas, que são descartadas em aterros, não houve necessidade de nenhum tipo de pré-tratamento nem esterilização do meio de cultura, uma vez que, a levedura se desenvolveu e produziu, apesar das dificuldades de mistura iniciais, 41,7 g.L⁻¹ de etanol com um rendimento de conversão de 48,9% e produtividade de 0,78 g.L⁻¹.h⁻¹, em comparação com o processo por batelada alimentada nas mesmas condições (MENDES, et al., 2016). Por estes motivos esta levedura foi empregada nesta pesquisa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

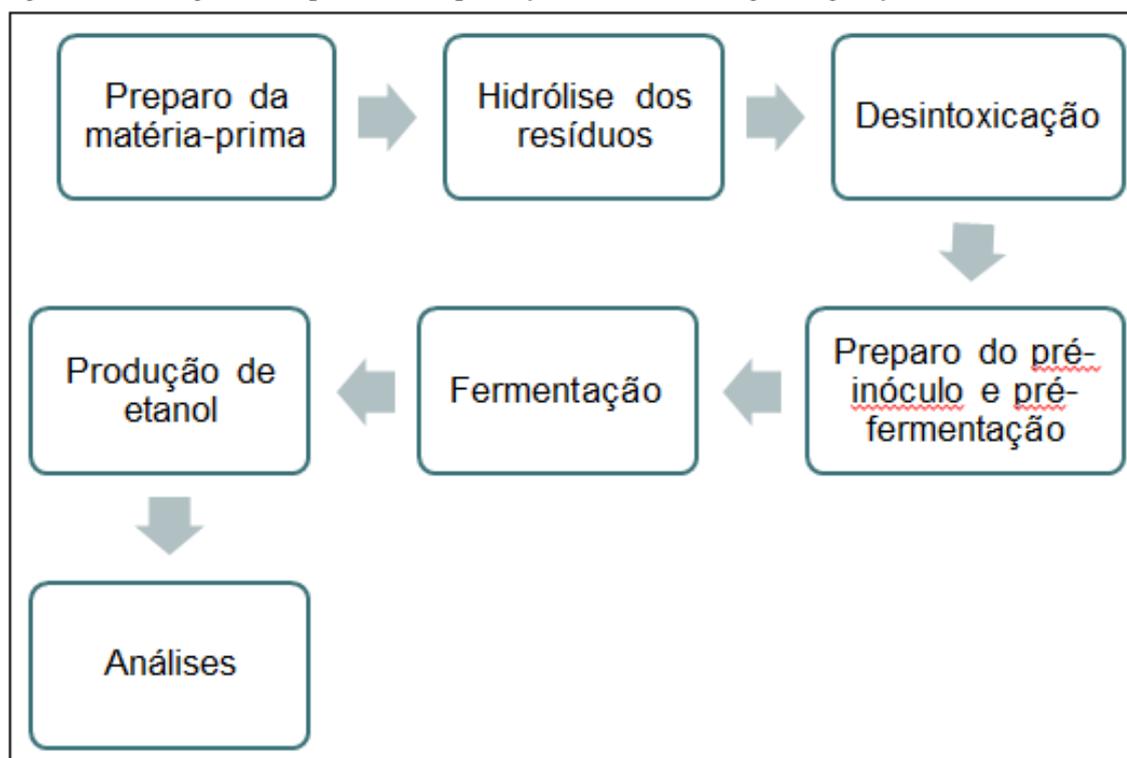
Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biopolímeros do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA) do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) de São José do Rio Preto – SP.

4.2 MATÉRIA-PRIMA

Para o processo de fermentação, foi utilizado sabugo de milho (*Zea mays* L.), como biomassa. Os sabugos de milho foram coletados em barracas de venda localizadas na represa municipal de São José do Rio Preto, no período entre março e abril de 2017.

A Figura 7 apresenta um fluxograma simplificado da produção de etanol de segunda geração.

Figura 7 - Fluxograma do processo de produção de etanol de segunda geração.



4.3 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

Os sabugos, usados como substrato, foram cortados manualmente com auxílio de um facão inox em pedaços menores que 3 cm, distribuídos em bandejas de inox e expostos ao sol, durante aproximadamente 24 h, ou até que ficassem duros e quebradiços.

Em seguida, as amostras secas foram moídas em um moedor de facas e peneiradas até 14 mash, acondicionadas em frascos de vidro e armazenadas à temperatura ambiente.

4.4 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA

Para o preparo da hidrólise da amostra, o pré-tratamento foi realizado de acordo com o método proposto por Monsalve, Perez e Colorado (2006), com algumas modificações. Foram adicionados 100 ml de ácido sulfúrico nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0%, respectivamente, para cada 10 g de amostra seca e moída, com subsequente aquecimento em autoclave a 121 °C durante 15 e 30 min.

Ao término do pré-tratamento, o pH do material hidrolisado foi neutralizado, até atingir pH 7,0, com uma solução de NaOH (50%). Após as etapas de hidrólise e neutralização, a biomassa obtida foi filtrada em papel filtro Whatman n°.1 para a separação dos sólidos, os quais foram descartados. No filtrado, foram realizadas as determinações das concentrações de açúcares totais e redutores, conforme descritos no item 4.13.4 e 4.13.5 respectivamente, e compostos fenólicos foram analisados conforme descrito no item 4.13.6.

4.5 DESINTOXICAÇÃO DO HIDROLISADO

O processo de desintoxicação foi feito de acordo com Mussatto e Roberto (2004b), com algumas modificações. Primeiramente, foram adicionados 2,5% de carvão ativo ao hidrolisado, e a mistura foi submetida à agitação de 200 rpm, a 30 °C, por 1 h. A mistura foi centrifugada (5000 g, 20 min.) e filtrada. Posteriormente, foram realizadas análises de açúcares redutores e compostos fenólicos no filtrado, conforme descritos nos itens 4.13.5 e 4.13.6, respectivamente.

4.6 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado para a fermentação do hidrolisado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602. A levedura foi adquirida da American Type Culture Collection e foi doada ao Laboratório de Biopolímeros (IBILCE/UNESP) pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra de Portugal.

4.7 MEIO DE MANUTENÇÃO

A levedura foi crescida em estufa a 30 °C por 24 h em tubos de ensaio que continham o meio de manutenção especificado na Tabela 4. Foi realizado um estoque de trabalho armazenado em ultrafreezer a -80 °C para retiradas periódicas durante toda a pesquisa. O meio de manutenção apresenta pH inicial igual a 5,0.

Tabela 4 – Meio de manutenção utilizado para levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602.

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

4.8 ATIVAÇÃO DA LEVEDURA

A cepa de *S. cerevisiae* foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de manutenção (Tabela 4), conforme descrito no item 4.6, e estes foram incubados em estufa a 30°C, por 24 h.

4.9 PRÉ-INÓCULO

Uma pré-fermentação foi realizada utilizando 5 tubos de ensaio contendo o crescimento celular obtido na ativação da levedura. O conteúdo dos tubos foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de manutenção

(Tabela 4, sem adição de ágar), que apresentou pH igual a 5,0, previamente esterilizado, e incubado a 30 °C, por 24 h com agitação de 100 rpm.

4.10 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

A padronização do inóculo foi realizada de acordo com Vignoli (2003), para garantir que a concentração de inóculo inicial fosse igual para todos os ensaios de fermentação.

A suspensão celular obtida na pré-fermentação (item 4.9) foi centrifugada a 6941 g, por 15 min., para separação de células. Essas foram ressuspensas em água destilada estéril de forma a se obter uma suspensão celular com absorbância de 0,6 em um comprimento de onda de 600 nm.

Separadamente foi construída uma curva de calibração (em anexo item 8.4) com diferentes concentrações da suspensão celular de *S. cerevisiae* ATCC 26602, que relaciona a absorbância com a concentração celular, com a qual foi possível calcular o inóculo inicial de células a ser transferido para os frascos de Erlenmeyer contendo o meio de fermentação.

4.11 MEIOS DE FERMENTAÇÃO

A produção de etanol foi realizada utilizando os meios de fermentação especificados a seguir:

4.11.1 Meio sintético (Padrão)

O meio sintético foi semelhante ao definido por Rodríguez e Callieri (1986), com algumas modificações, conforme especificado na Tabela 5. Para os ensaios com a levedura, foram usadas soluções de glicose em diferentes concentrações (40 e 60 g/L), que apresentou pH inicial igual a 7,0. A solução de açúcares foi esterilizada separadamente a 121 °C, por 15 min, e depois de resfriada até a temperatura ambiente, foi misturada assepticamente no momento do preparo do meio de fermentação contendo o meio sintético com os demais constituintes que foram previamente dissolvidos em água destilada e esterilizados.

Tabela 5 – Composição do Meio Sintético utilizando nos ensaios para a fermentação.

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

4.11.2 Meio contendo o sabugo de milho hidrolisado

Os hidrolisados foram padronizados com base nas concentrações de açúcares redutores nas concentrações de 20, 40 e 60 g/L.

O caldo hidrolisado com a concentração adequada de açúcares foi esterilizado separadamente a 121°C, por 15 min., e, em seguida, foi adicionado o meio sintético apresentado no item 4.11.1 (Tabela 5).

4.12 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

4.12.1 Avaliação das variáveis que podem influenciar a levedura *S. cerevisiae*

As variáveis estudadas foram o tempo de fermentação da levedura e a velocidade de agitação, onde foram realizadas fermentações agitadas a 50 e 100 rpm, para a observação do melhor tempo e agitação para seu crescimento e produção de etanol.

A determinação das condições de trabalho da levedura foi realizada a partir da fermentação de um meio sintético, acrescido de glicose, com incubação a 30 °C durante um período de 18 horas. Amostras foram retiradas a cada hora, para análise do crescimento da levedura e para a análise da produção de etanol.

As fermentações foram realizadas em agitador orbital rotatório com temperatura controlada (30 °C) em triplicata e com agitação de 50 e 100 rpm.

4.12.2 Avaliação das fermentações utilizando os hidrolisados de sabugo de milho

As fermentações utilizando os hidrolisados foram feitas com diferentes concentrações do hidrolisado (20, 40 e 60 g/L) em agitador orbital rotatório com

temperatura controlada (30 °C) em triplicata, sem agitação e com agitação de 50 e 100 rpm.

Foram analisados o crescimento da levedura durante um período de fermentação de 48 horas, produção de etanol e a variação do pH no meio de fermentação, com retirada de amostras a cada 12 horas de fermentação em um experimento e retirada a cada 6 horas em outro experimento.

4.13 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.13.1 Determinação do pH final

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

4.13.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por meio das medidas de absorvância no espectrofotômetro Biochrom, modelo Libra S22. Para isto, as células contidas nos hidrolisados fermentados foram separadas como descrito no item 4.10 e quantificadas com a curva de calibração (em anexo no item 8.4) construída para determinar a quantidade de crescimento da levedura.

4.13.3 Determinação de etanol

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

4.13.4 Determinação de açúcares totais (AT)

Os açúcares totais (AT) foram determinados pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956). Foram realizadas leituras de absorvância no comprimento de onda de 490 nm, e a quantificação foi determinada por curva padrão de glicose em diferentes concentrações (em anexo no item 8.1).

4.13.5 Determinação de açúcares redutores (AR)

Os açúcares redutores (AR) foram determinados de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Nelson (1944) e Somogyi (1952). Foram realizadas leituras de absorvância no comprimento de onda de 540 nm, e a quantificação foi determinada por curva padrão de glicose utilizando diferentes concentrações (em anexo no item 8.2).

4.13.6 Determinação do teor de compostos fenólicos

A concentração de fenóis totais foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu modificado por Chaovanalikit e Wrolstad (2004). Uma amostra de 0,5 mL do hidrolisado de sabugo de milho foi misturada com 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de água destilada. A mistura foi deixada em repouso por 10 min, à temperatura ambiente. Depois foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio (20%), as amostras ficaram em repouso novamente, por 20 min., à 40 °C. Foram realizadas leituras de absorvância no comprimento de onda de 755 nm. Foi construída uma curva de calibração (em anexo no item 8.3).

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados foi realizada utilizando o programa computacional Statistica 7.0 (STATSOFT, 1996). Os resultados das variáveis analisadas foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), e, quando houve diferença estatística, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 HIDRÓLISE ÁCIDA

5.1.1 Pré-tratamento da biomassa e Desintoxicação do hidrolisado

Testes preliminares foram realizados a fim de se comparar o desempenho da utilização de diferentes concentrações de ácido sulfúrico para a hidrólise de sabugo de milho, com diferentes tempos de aquecimento, com a finalidade de estabelecer a metodologia a ser utilizada no pré-tratamento da biomassa. Para isto, a hidrólise foi realizada com diferentes concentrações de H_2SO_4 (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0%) e aquecimento de 15 e 30 min., em autoclave na temperatura de 121 °C.

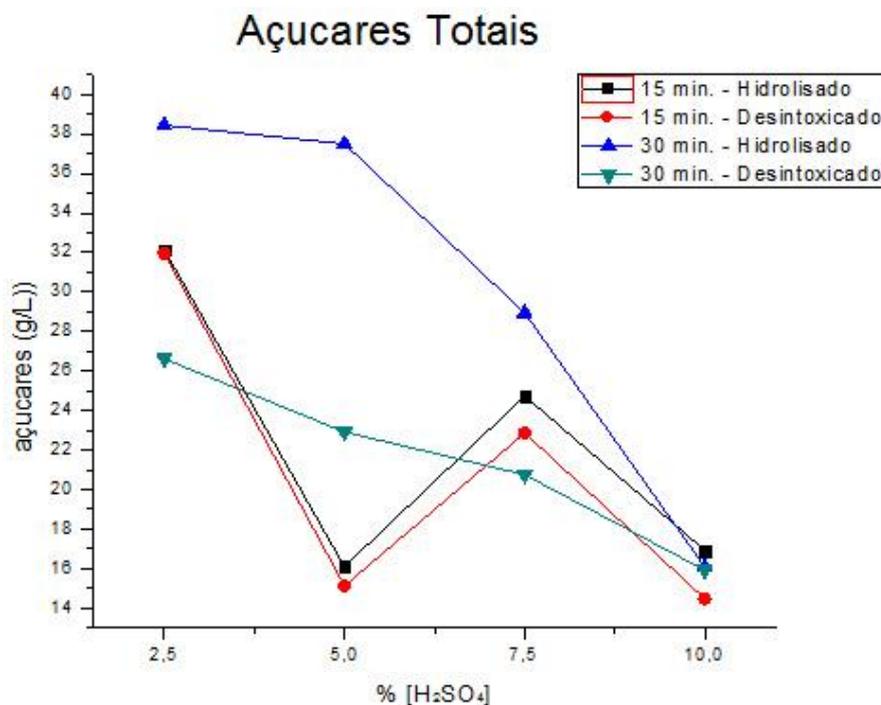
Após esses tratamentos, foram determinadas as concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e compostos fenólicos obtidos durante as hidrólises. Essas análises foram realizadas para comparar e determinar a concentração de ácido que libera mais açúcares fermentescíveis, que assim, poderão ser utilizados pela levedura para produção de etanol por fermentação.

Depois da hidrólise, as amostras contendo o hidrolisado de sabugo de milho foram desintoxicadas pela adição de carvão ativado, visando a diminuir o conteúdo de compostos inibidores da fermentação, formados pela adição do ácido sulfúrico durante o aquecimento.

5.1.2 Determinação de açúcares totais e redutores

Os resultados provenientes das análises de açúcares totais da biomassa hidrolisada com e sem desintoxicação estão mostrados na Figura 8.

Figura 8 – Resultados provenientes das análises de açúcares totais do sabugo de milho hidrolisado com diferentes concentrações de H_2SO_4 e aquecimento de 15 e 30 min., com e sem desintoxicação.



Na Figura 8, pode ser observado que a análise de açúcares totais indica que os dois tempos de aquecimento da hidrólise tiveram a maior quantidade de açúcares liberados com 2,5% de H_2SO_4 . Ao se aumentar a concentração do ácido para 5,0%, a liberação de açúcar foi menor nos dois tempos, aumentando um pouco para 7,5% no tempo de aquecimento de 15 min. e diminuindo para a concentração de 10,0% nos dois tempos. Destes testes, o tempo de aquecimento de 30 min. apresentou maior liberação de açúcares totais do que o de 15 min. para todas as concentrações de H_2SO_4 testadas. Também pode ser observado que, as concentrações de açúcares diminuíram com a centrifugação e com a filtração feitas no processo de desintoxicação com o carvão ativado, como para o tempo de 30 min. na concentração de 2,5% de H_2SO_4 , que foi o ponto de maior liberação de açúcares, de 38,44 g/L caiu para 26,61 g/L, e para esta mesma concentração e hidrólise de 15 min. o teor de açúcares de 32,13 g/L diminuiu ficando em 31,96 g/L (Figura 8).

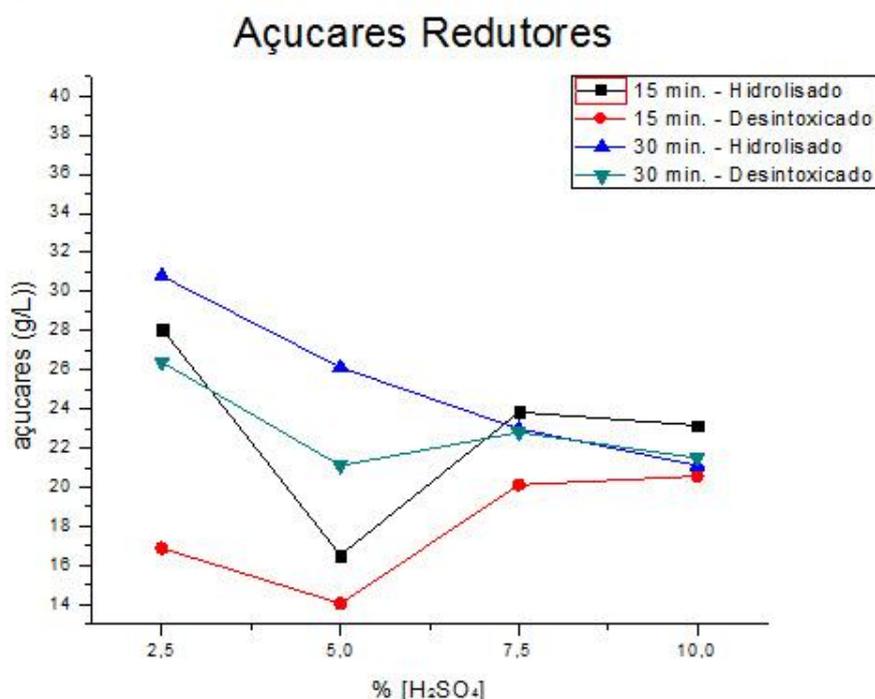
El-Zawawy et al. (2011) fizeram uma hidrólise ácida de sabugo de milho, com a concentração de 5% de H_2SO_4 e tempo de aquecimento de 30 min., e encontraram 4,5 g/L de açúcares totais, uma concentração abaixo da encontrada neste trabalho, que foi de 37,52 g/L de açúcares totais em 5% de H_2SO_4 e 30 min. de hidrólise.

Trinca et al. (2017) realizaram uma hidrólise ácida em casca de soja utilizando diferentes concentrações de ácido sulfúrico com e sem aquecimento em autoclave durante 15 e 30 min., seus resultados mostraram que houve maior liberação de açúcares totais em seus experimentos com aquecimento quando comparados com os sem aquecimento, tanto para o tempo de 15 min. quanto para o tempo de 30 min. os teores de açúcares liberados foram maiores e próximos nos dois tempos. A maior liberação vista em seus resultados foi de 69,3 g/L em 30 min. com aquecimento com a 3,5% de H₂SO₄, valor acima do resultado deste experimento, que apresentou sua maior liberação em 2,5% de H₂SO₄ com 30 min. de hidrólise, que foi de 38,44 g/L.

Em uma pesquisa do pré-tratamento ácido de palha de milho realizada por Lu et al. (2007) onde foram testadas as concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0% de H₂SO₄ com a temperatura de aquecimento variando entre 80, 100 e 120 °C foi identificado que as melhores condições eram a concentração de 2,0% de H₂SO₄ em um tempo de reação de 43 min. a 120 °C. O que difere com nosso trabalho que utilizou diferentes concentrações de ácido mostrando que não há necessidade de utilizar maior tempo de hidrólise, uma vez que foram utilizados 15 e 30 min. a 121°C.

A Figura 9 mostra a determinação de açúcares redutores, e pode ser observado o mesmo comportamento das amostras do hidrolisado durante as análises de açúcares totais. As amostras do sabugo de milho, após a hidrólise, liberaram maior concentração de açúcares redutores na concentração de 2,5% de ácido sulfúrico nos dois tempos de aquecimento. Dentre os testes, o aquecimento de 30 min. apresentou a maior liberação de açúcares redutores para as concentrações 2,5 e 5,0. Após a centrifugação feita no processo de desintoxicação, houve decréscimo na concentração dos açúcares. Os resultados obtidos da avaliação de açúcares redutores estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 – Resultados provenientes das análises de açúcares redutores do sabugo de milho hidrolisado com diferentes concentrações de H_2SO_4 e aquecimento de 15 e 30 min., com e sem desintoxicação.



Os valores de açúcares redutores neste trabalho, 28,10 g/L para 15 min. de hidrólise com 2,5 % de H_2SO_4 e 30,79 g/L para 30 min. de hidrólise com 2,5 % de H_2SO_4 , foram melhores que os obtidos por Santos (2014), onde foi avaliado o teor de açúcares redutores totais (ART) de palha e sabugo de milho pré-tratado com 0,5% de H_2SO_4 a 120°C por 15 min., em seguida hidrolisado com 2 mL de enzima comercial por 72 h a 150 rpm, obtendo-se 19,6 g/L de ART para palha e 6,1 g/L de ART para o sabugo.

Em outro trabalho, Rocha et al. (2016) fizeram um pré-tratamento ácido para sabugo e palha de milho, avaliando o tempo de hidrólise, temperatura e concentração de H_2SO_4 , após a hidrólise ácida e hidrólise enzimática relatam que obtiveram maiores teores de ART utilizando baixas concentrações de ácido e elevadas temperaturas (42,6 g/L em teor de ART para o sabugo de milho, utilizando 0,5% de H_2SO_4 a 120°C por 15 min. e 61,5 g/L em teor de ART, para a palha de milho, utilizando 2% de H_2SO_4 a 110°C por 7 min.), indicando também que um menor tempo seria a melhor opção para se obter maiores valores de açúcares redutores (7 a 15 min.).

Vieira et al. (2015) estudaram a influencia das condições de hidrólise enzimática na conversão de açúcares presentes nos resíduos de milho. Estes foram pré-tratados com 0,5% de H_2SO_4 a 121°C por 15 min. e depois submetidos à hidrólise

enzimática, com 48 h de fermentação e obtiveram 0,14 g ART/ g de palha de milho hidrolisada e 0,13 g ART/g de sabugo de milho hidrolisado.

Carvalho (2016) estudou resíduos de milho (palha e sabugo) pré-tratados com 0,5% de H_2SO_4 a $121^\circ C$ por 15 min. de hidrólise, seguido de hidrólise enzimática de 48 h, as melhores condições indicaram 30,68 g/L de ART para a palha de milho e 21,11 g/L de ART para o sabugo de milho. Valores inferiores aos encontrados neste trabalho, que foram de 28,10 g/L de ART para 15 min. de hidrólise com 2,5 % de H_2SO_4 e 30,79 g/L de ART para 30 min. de hidrólise com 2,5 % de H_2SO_4 , na hidrólise de sabugo de milho.

Portanto, a partir dos resultados avaliados em nosso trabalho, em comparação com estes estudos relatados foi possível observar que não houve problemas ao se trabalhar com um nível superior de temperatura ($121^\circ C$), onde, uma maior desorganização na estrutura lignocelulósica da matéria-prima ocorre, tornando os açúcares fermentescíveis mais acessíveis, liberando maiores teores de ART após etapa de pré-tratamento (DAGNINO et al., 2012).

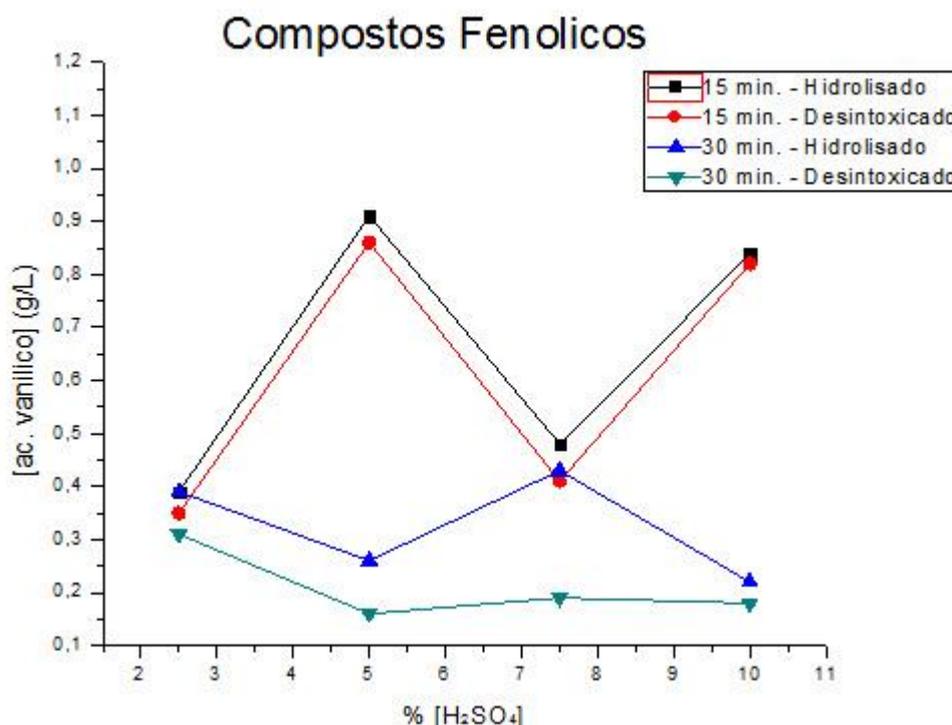
Outros pesquisadores, utilizando resíduos lignocelulósicos diferentes do utilizado neste trabalho encontraram valores de ART menores aos obtidos neste trabalho. Por exemplo, Gomes (2015) pré-tratou bagaço de cana-de-açúcar com 0,5% de H_2SO_4 a $120^\circ C$ por 15 min. com uma enzima comercial por 72 h a 150 rpm obtendo 13,70 g/L de ART. Pereira et al. (2015) também verificaram que um pré-tratamento com ácido diluído (1,5% H_2SO_4 a $121^\circ C$, 30 min.) foi mais eficiente para a liberação de açúcares em resíduos de cana-de-açúcar.

Trinca et al. (2017) em sua hidrólise ácida em casca de soja utilizando diferentes concentrações de H_2SO_4 com e sem aquecimento em autoclave durante 15 e 30 min., encontraram a maior liberação de ART com 4,0% de H_2SO_4 e 30 min. de aquecimento, que foi de 40,9 g/L, em maiores concentrações de ácido observou que houve redução na liberação de ART, assim como no presente estudo, Trinca et al. (2017) também observaram que ao se aumentar a concentração do ácido o teor de ART diminui, sendo que neste trabalho foram encontrados 28,10 g/L para 15 min. de hidrólise na concentração de 2,5% de H_2SO_4 e 30,79 g/L de 30 min. de hidrólise com 2,5% de H_2SO_4 ; já para as concentrações de H_2SO_4 mais altas (5,0; 7,5 e 10%) as concentrações de AR diminuíram.

5.1.3 Determinação de compostos fenólicos

A Figura 10 apresenta o resultado das análises de compostos fenólicos após hidrólise ácida e aquecimento em autoclave durante 15 e 30 min. Na Figura 10, pode ser observado que o aquecimento de 15 min. libera maior quantidade de compostos fenólicos do que o de 30 min. Este mesmo comportamento foi observado, também, após desintoxicação.

Figura 10 – Resultados provenientes das análises de compostos fenólicos do sabugo de milho hidrolisado com diferentes concentrações de H_2SO_4 e aquecimento de 15 e 30 min., com e sem desintoxicação.



Em seu trabalho de revisão bibliográfica Almeida et al. (2007) também identificaram que com o uso de altas concentrações de ácido ocorre a formação de produtos inibidores, responsáveis pela degradação dos açúcares presentes no material lignocelulósico.

Testes foram feitos por Mussatto e Roberto (2004) com cinco diferentes marcas de carvão ativado em hidrolisados de palha de arroz; cada marca se comportou de uma forma, porém, os que possuíam menor granulometria foram os mais eficazes. O processo de desintoxicação utilizado e a granulometria do carvão ativado usado

influenciam na eficácia do processo. O tempo de contato do carvão com o meio hidrolisado também influencia na eficácia do carvão ativo (TRINCA, 2014).

Michelin et al. (2016) estudaram o efeito de compostos fenólicos sobre as atividades celulolíticas e hemicelulolíticas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com água quente sob pressão a 180 ou 200°C por 30 min. Estes pesquisadores observaram que o pré-tratamento liberou compostos fenólicos que inibem e/ou desativam as enzimas celulasas e hemicelulasas. Além disso, também foram pré-tratados com acetona, os fenólicos liberados nos extratos de acetona desativaram fortemente a β -glicosidade e a β -xilosidase. As condições utilizadas neste trabalho foram menos drásticas do que as apresentadas por estes autores, pois a temperatura deste trabalho atingiu 121°C.

Larsson et al. (1999b) avaliaram as concentrações e os efeitos do ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico em hidrólise ácida de pinho da Noruega e em fermentações com *S. cerevisiae*. Eles encontraram que eram necessárias concentrações próximas de 100 mM para observar os efeitos inibitórios.

Trinca et al. (2017) estudaram a influencia da presença de compostos fenólicos que foram formados nos hidrolisados de casca de soja, onde o hidrolisado foi utilizado como substrato no meio de cultivo para produção de etanol, neste estudo pode ser observado que houve maior liberação de compostos fenólicos quando havia aquecimento das amostras, e que também a liberação destes compostos aumentava com o aumento da concentração de H₂SO₄. Em seus experimentos utilizando concentrações do ácido de 3,5%, 4,0% e 4,5% foi verificada a presença de até 0,6 mg/g de compostos fenólicos, enquanto que, nas concentrações menores de H₂SO₄ apenas 0,2 mg/g. Com aquecimento houve maior liberação de compostos fenólicos ao se utilizar 5,0% de H₂SO₄ com 15 min. de aquecimento, que foi de 1,97 g/g. Portanto, no estudo de Trinca et al. (2017) é possível constatar que o aquecimento se mostra necessário para aumentar a liberação de açúcares fermentescíveis e também para diminuir o tempo de hidrólise, entretanto, ocorre a liberação de compostos fenólicos.

Ao se utilizar concentrações mais baixas de H₂SO₄ o risco de corrosão de equipamentos diminui, uma menor quantidade de compostos fenólicos é liberada, além de diminuir os custos devido a utilização de menor quantidade de ácido. Temperaturas mais baixas diminuem os gastos com energia diminuindo assim os custos do processo (TOMÁS-PEJÓ et al., 2011).

Para este trabalho, a comparação dos resultados apresentados nas Figuras 8 e 9 mostra que a melhor concentração de H₂SO₄ a ser utilizada é 2,5%, onde houve menor

formação de compostos fenólicos. Porém para a escolha do melhor tempo de aquecimento da hidrólise, foi necessária uma nova avaliação.

5.1.4 Determinação do tempo de aquecimento da hidrólise

Os resultados obtidos na nova hidrólise (2,5% de H₂SO₄ com aquecimento de 15 e 30 min.), realizada para a escolha de melhor tempo de aquecimento estão na Tabela 6. A Tabela 6 apresenta os valores resultantes das análises de açúcares totais, açúcares redutores e compostos fenólicos, realizadas após a hidrólise e após a desintoxicação dos hidrolisados. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 6 – Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores (g/L) e compostos fenólicos (ác. vanílico g/L) liberados durante a hidrólise ácida com 2,5% de H₂SO₄, com aquecimento de 15 e 30 min., antes e após desintoxicação.

Análise	Hidrolisados	Desintoxicados	Hidrolisados	Desintoxicados
	15 min.	15 min.	30 min.	30 min.
Açúcares Totais (g/L)	29,98 ± 4,44	28,80 ± 4,25	32,60 ± 2,36	30,65 ± 1,49
Açúcares Redutores (g/L)	20,52 ± 2,02	18,20 ± 1,26	28,69 ± 1,36	25,02 ± 1,28
Compostos Fenólicos (ác. vanílico g/L)	0,97 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,97 ± 0,03	0,09 ± 0,02

Na Tabela 6, estão demonstrados os resultados obtidos para açúcares totais, e pode ser observado que, em 30 min. de aquecimento, foi liberada a maior concentração de açúcares em g/L e que, após a desintoxicação, essa concentração diminuiu. Para os açúcares redutores a maior concentração também foi obtida no tempo de aquecimento de 30 min., após a desintoxicação essa concentração também diminuiu. A concentração de compostos fenólicos diminuiu após a desintoxicação nos dois tempos de aquecimento (Tabela 6).

Em estudo de Wang et al. (2009) é relatado que a utilização de ácidos diluídos, que variam de 0,1% a 2,0% (p/v), são mais eficazes e relatam que alcançaram 80% de conversão de celulose presente em pastas de madeira de eucalipto. Zhu et al. (2009) obtiveram cerca de 40% da conversão de celulose, em madeira pré-tratada a 180 °C

com uma concentração de ácido de 1,8% seguida de moagem de disco. E em seus estudos Mosier et al. (2005) também concluíram que a hidrólise de matérias lignocelulósicas com H₂SO₄ diluído apresenta melhores resultados em comparação com outros ácidos. Um rendimento de sacarificação de 74% foi obtido a partir de palha de trigo quando submetido a 0,75% de H₂SO₄ a 121 °C por 1 h.

Portanto, a partir dos resultados encontrados nesta hidrólise, foi determinado que a melhor concentração de H₂SO₄ para a realização da hidrólise é 2,5% com 30 min. de aquecimento, onde houve a maior liberação de açúcares redutores e menor liberação de compostos fenólicos no processo de hidrólise. Porém, os tempos de aquecimento (15 e 30 min.) foram avaliados no processo fermentativo.

5.2 PROCESSO FERMENTATIVO

5.2.1 Meio de fermentação contendo o hidrolisado de sabugo de milho

O sabugo de milho foi submetido a hidrólises com tempos de 15 e 30 minutos de aquecimento em autoclave, seguido de desintoxicação, e foi utilizado como fonte de carbono durante a fermentação para a escolha do melhor tempo de aquecimento de hidrólise do sabugo.

A fermentação ocorreu a 50 rpm durante 36 horas, com retiradas de amostras para análises a cada 12 horas, assim, foram verificadas as concentrações remanescentes de açúcares totais, redutores e compostos fenólicos. Também foram avaliados o crescimento celular da levedura e foi realizada a determinação da produção de etanol e o comportamento do pH no meio durante toda a fermentação.

A concentração inicial de açúcares redutores foi de 18,20 g/L no hidrolisado aquecido durante 15 min. e de 25,02 g/L no hidrolisado aquecido durante 30 min., como apresentados na Tabela 6 do procedimento anterior. Os resultados dos açúcares e compostos fenólicos remanescentes obtidos na fermentação estão representados nas Figuras 11, 12 e 13.

Figura 11 – Concentrações de açúcares totais em g/L remanescentes após realização do processo de fermentação completo com aquecimento de 15 e 30 min. no hidrolisado com 2,5% de H_2SO_4 e desintoxicado.

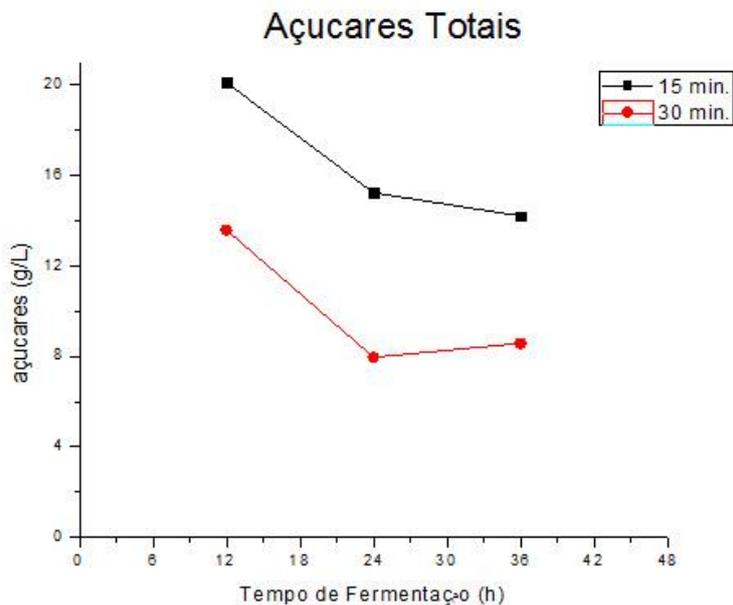
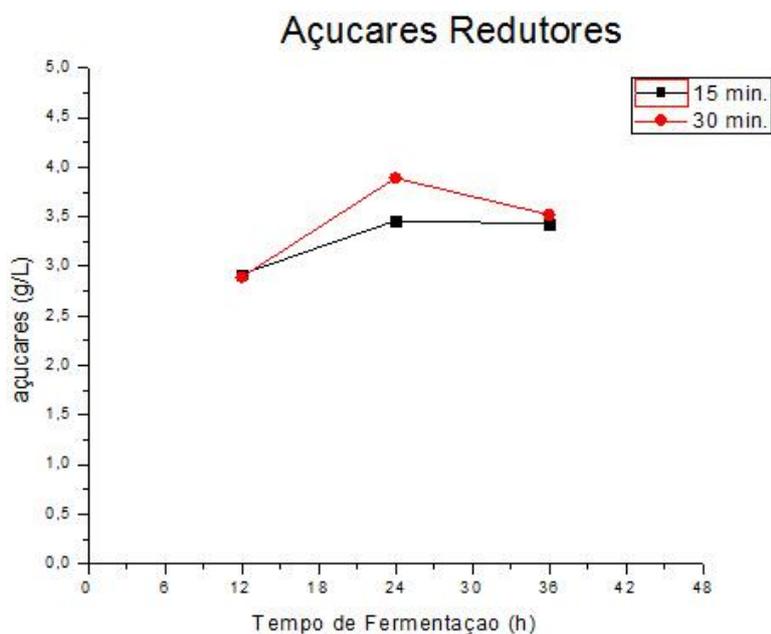


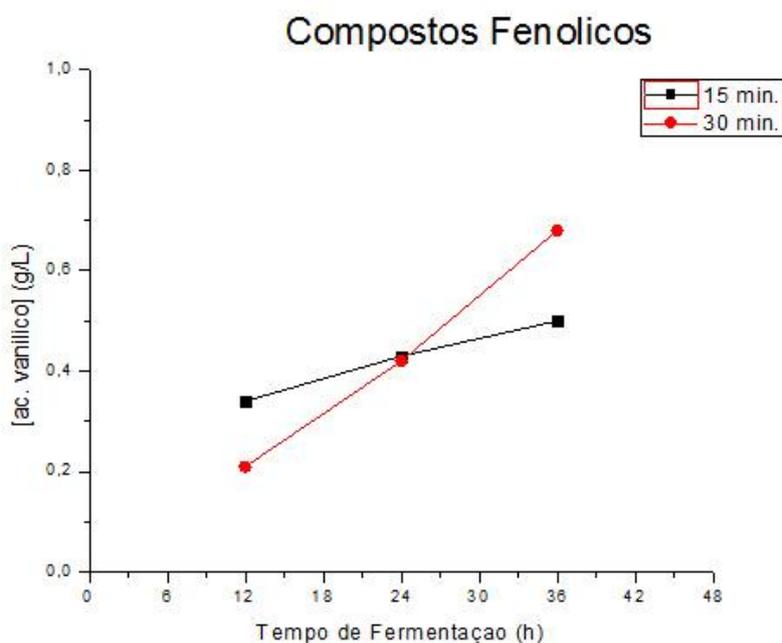
Figura 12 – Concentrações de açúcares redutores em g/L remanescentes após realização do processo de fermentação completa com aquecimento de 15 e 30 min no hidrolisado com 2,5% de H_2SO_4 e desintoxicado.



Por meio da Figura 12 é possível observar que restaram 3,43 g/L de açúcares redutores no meio hidrolisado aquecido por 15 min., onde a fermentação foi iniciada com 18,20 g/L de açúcares redutores, mostrando que houve um aproveitamento de 81,15% dos açúcares redutores presentes no meio. Para o meio contendo o hidrolisado

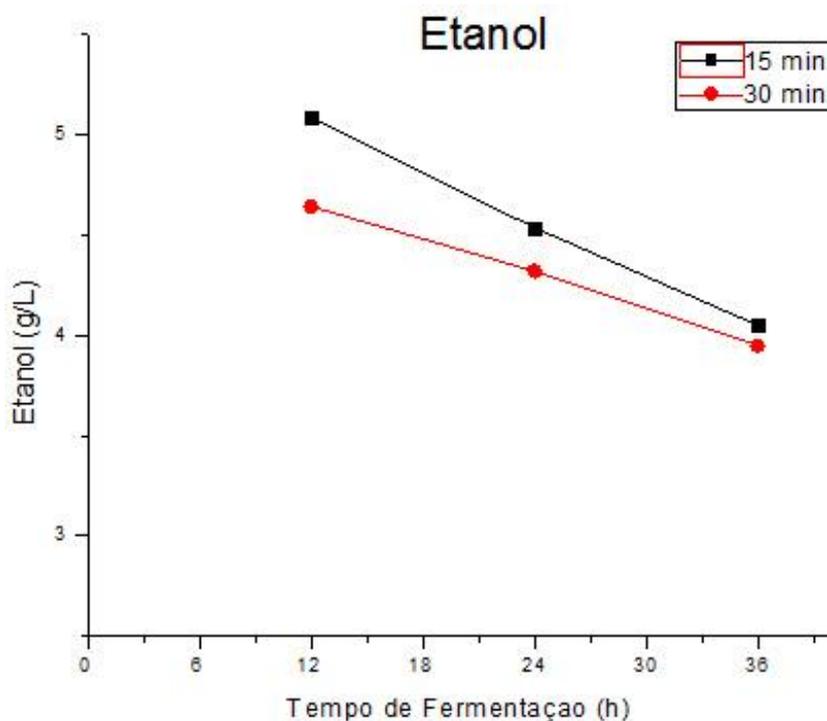
aquecido por 30 min., a concentração inicial foi de 25,02 g/L restando 3,52 g/L de açúcares redutores no meio após o período de 36 h de fermentação, assim, é possível observar que houve consumo de 85,93% dos açúcares redutores. Com relação aos compostos fenólicos, pode-se observar também que no menor tempo de fermentação sua concentração foi a menor detectada (Figura 13).

Figura 13 – Resultado das análises de compostos fenólicos após hidrólise com H₂SO₄ 2,5%, e aquecimento em autoclave durante 15 e 30 min. no hidrolisado desintoxicado.



A produção de etanol foi maior nas primeiras horas de fermentação e, à medida que esta foi transcorrendo houve diminuição até o seu término. Isso mostra que a levedura realiza a fermentação em um tempo inferior de incubação (Figura 14).

Figura 14 – Produção de etanol por *S. cerevisiae* no meio de cultura contendo o hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 36 horas no hidrolisado desintoxicado.



Rocha et al., (2016), avaliaram a produção de etanol a partir do pré-tratamento ácido em sabugo e palha de milho em uma fermentação de 24 h. A maior eficiência fermentativa em seu experimento se deu com o hidrolisado por 15 min. utilizando 0,5% de H_2SO_4 a 120°C, onde obtiveram 2,2 g/L de etanol para sabugo de milho e 9,3 g/L de etanol para palha de milho. Sua eficiência fermentativa para o sabugo de milho foi menor do que a encontrada em nosso trabalho, que foi de 5,08 g/L em 12 h de fermentação.

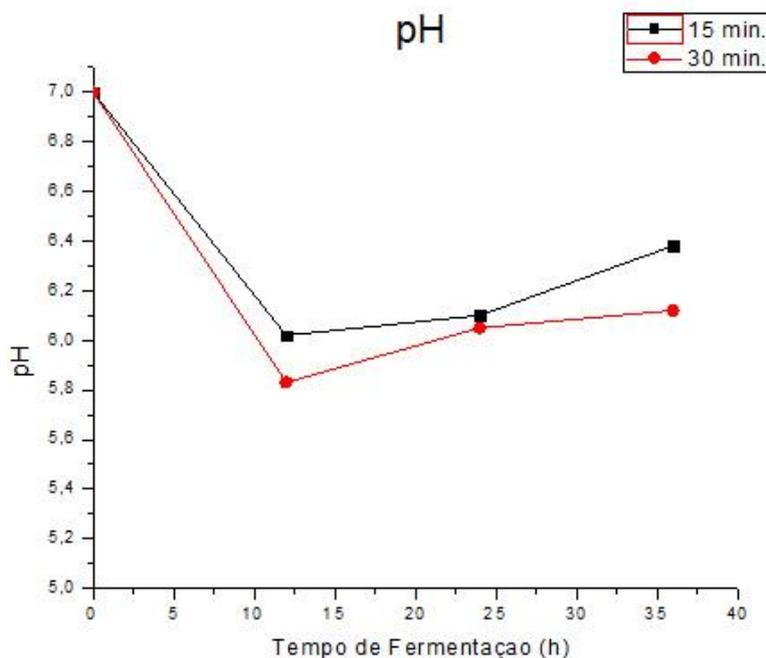
Alguns autores avaliaram a produção de etanol obtido a partir de outros métodos de pré-tratamento para hidrólise de resíduos de milho para serem usados como substrato, como por exemplo, o uso de amônia como pré-tratamento de sabugo de milho, onde Cao et al. (1996) obtiveram 47 g/L de etanol a partir de 36 horas de fermentação. Zhang et al. (2010) obtiveram altos rendimentos de etanol (29,4 e 69,2 g/L) testando três tipos de pré-tratamentos para sabugo de milho, combinando o uso de amônia, ácido fórmico e o uso de ácido sulfúrico diluído com NaOH. Em seu trabalho Lu et al. (2013) fizeram o pré-tratamento de palha de milho utilizando CO_2 supercrítico, obtendo um rendimento de 77,8% de açúcares. Zhao & Xia (2009) realizaram um pré-tratamento alcalino na palha de milho, encontrando 27,8 g/L de etanol após 72 horas de fermentação.

Carvalho (2016) estudou resíduos de milho (palha e sabugo) pré-tratados com 0,5% de H₂SO₄ a 121°C por 48 h de hidrólise, seguido de hidrólise enzimática e fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* por 24 h obtendo 3,9 g/L de álcool.

Trinca et al. (2017) estudou o efeito da hidrólise ácida em cascas de soja para a produção de etanol 2G por diferentes processos, por meio da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, pela levedura *Candida tropicalis* ATCC 7349 e por co-fermentação com os dois microrganismos, sua maior produção de etanol ocorreu com a levedura *C. tropicalis* em 24 h de fermentação, nessas mesmas condições com 8 h de fermentação houve a produção de 9,8 g/L, sendo esta a segunda maior produção de etanol. A bactéria *Z. mobilis* foi a de menor produção, seu maior aproveitamento foi de 3,5 g/L em 8 h de fermentação. Durante a co-fermentação, a maior produção de etanol foi de 7,4 g/L em 12 horas.

O pH se manteve praticamente constante, variou entre 5,8 e 6,5, durante todo o período de fermentação (Figura 15). Trinca (2014) que avaliou a produção de etanol pelo consórcio com *Z. mobilis* e *C. Tropicalis* em hidrolisado ácido da casca de soja, e seus meios de fermentação apresentavam o pH inicial igual a 6 e ao final de uma fermentação de 72 h estava entre 3,5 e 4,5. Essa redução do pH pode ocorrer devido a formação de produtos como o etanol.

Figura 15 – Comportamento do pH durante a produção de etanol por *S. cerevisiae* no meio de cultura contendo o hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 36 horas no hidrolisado desintoxicado.



5.2.2 Processo fermentativo completo utilizando o meio contendo o hidrolisado de sabugo de milho nas concentrações de 40 e 60 g/L

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores, foi escolhida a concentração de H_2SO_4 de 2,5% e o tempo de aquecimento de 30 min. para realizar a hidrólise. Esses parâmetros foram determinados como os mais eficientes.

Em uma pesquisa de pré-tratamento ácido utilizado para produção de etanol 2G a partir de palha e sabugo de milho, Santos (2014) também verificou que se deve trabalhar com menores concentrações de H_2SO_4 e elevadas temperaturas de aquecimento para que a estrutura lignocelulósica da matéria-prima sofra uma maior desorganização tornando os açúcares fermentescíveis mais acessíveis.

Portanto, a partir dos parâmetros selecionados, 2,5% de H_2SO_4 e 30 min. de aquecimento, foi realizada uma nova hidrólise do sabugo de milho, onde foram determinados açúcares totais, redutores e compostos fenólicos, em quintuplicata, resultando nas concentrações apresentadas na Tabela 7.

Em seguida do processo de hidrólise, o meio hidrolisado foi concentrado por evaporação em banho-maria até atingir 40 e 60 g/L de açúcares redutores, para assim, após a concentração, ser desintoxicado. A Tabela 7 apresenta as concentrações de

açúcares totais, redutores e compostos fenólicos encontrados após a concentração e a desintoxicação do hidrolisado do sabugo de milho. As análises para a desintoxicação do concentrado de 60 g/L não foram realizadas, pois houveram alguns incidentes, como por exemplo, houve dificuldade para concentrar esse meio até 60 g/L levando a possível contaminação do mesmo. Portanto, após a hidrólise do sabugo de milho, a concentração do meio para 40 g/L e a desintoxicação, o meio hidrolisado com concentração de 40 g/L foi fermentado por um período de incubação de 48 horas. A fermentação com o meio concentrado a 60 g/L não foi realizada.

Tabela 7 – Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores (g/L) e compostos fenólicos [ác. vanílico] (g/L) durante a hidrólise ácida com 2,5% de H₂SO₄, e com aquecimento de 30 min., antes e após desintoxicação.

Análise	Hidrolisado / 30 min.	Concentrado 40 g/L	Desintoxicado 40 g/L	Concentrado 60 g/L
Açúcares Totais (g/L)	31,14 ± 1,74	61,54 ± 2,21	59,91 ± 3,09	75,26 ± 1,12
Açúcares Redutores (g/L)	25,02 ± 0,92	54,36 ± 0,31	51,18 ± 2,06	68,68 ± 0,57
Compostos Fenólicos [ác. vanílico] (g/L)	0,80 ± 0,07	0,84 ± 0,04	0,29 ± 0,01	1,69 ± 0,08

Nesta Tabela 7 também pode ser observado que houve uma expressiva diminuição do teor de compostos fenólicos após a desintoxicação no concentrado de 40 g/L, mostrando que o processo foi eficiente.

Em pesquisas sobre a desintoxicação de hidrolisados, Hodge et al. (2009) usaram carvão ativado na concentração de 5% para reduzir a concentração de compostos fenólicos em hidrolisados de madeira, obtendo assim, redução de 98% dos compostos fenólicos presentes em seu meio. Neste trabalho foi utilizada a concentração de 2,5% de carvão ativado, e no resultado da Tabela 7 é possível observar que após a desintoxicação houve redução de 81,19% nos compostos fenólicos.

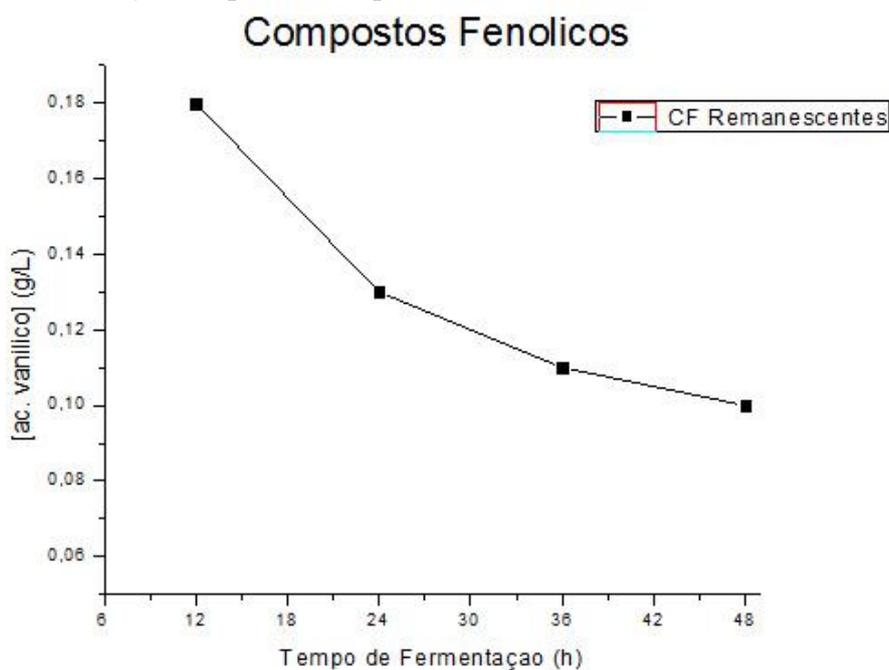
Análises de açúcares totais, açúcares redutores e compostos fenólicos remanescentes foram feitas durante a fermentação por um período de incubação de 48 horas, com agitação de 50 e 100 rpm durante o processo fermentativo. A Tabela 8 e a Figura 15 mostram estes resultados durante o processo de fermentação do hidrolisado desintoxicado aquecido durante 30 min.

Tabela 8 – Valores de concentração de açúcares em g/L remanescentes do processo de fermentação completo com aquecimento de 30 min. no hidrolisado desintoxicado com concentração de 40 g/L, com rotação de 50 e 100 rpm.

Tempo (h)	Açúcares Redutores (g/L)	
	50 rpm	100 rpm
0	51,18 ± 2,06	51,18 ± 2,06
12	23,83 ± 2,11	28,86 ± 1,84
24	18,59 ± 1,98	39,14 ± 1,68
36	25,32 ± 1,73	37,08 ± 1,47
48	12,03 ± 1,45	25,23 ± 1,72

Nesta Tabela 8 pode ser observada a diminuição da concentração de açúcares ao longo da fermentação no meio com agitação de 50 rpm. Para o meio com agitação de 100 rpm, os valores de açúcares redutores remanescentes se mostram com muitas alterações. Na Figura 16 observa-se a diminuição da concentração do teor de compostos fenólicos, lembrando que o teor inicial era de 0,29 [ácido vanílico] g/L.

Figura 16 – Concentrações de compostos fenólicos em g/L remanescentes após realizar o processo de fermentação completo com aquecimento de 30 min. no hidrolisado desintoxicado.

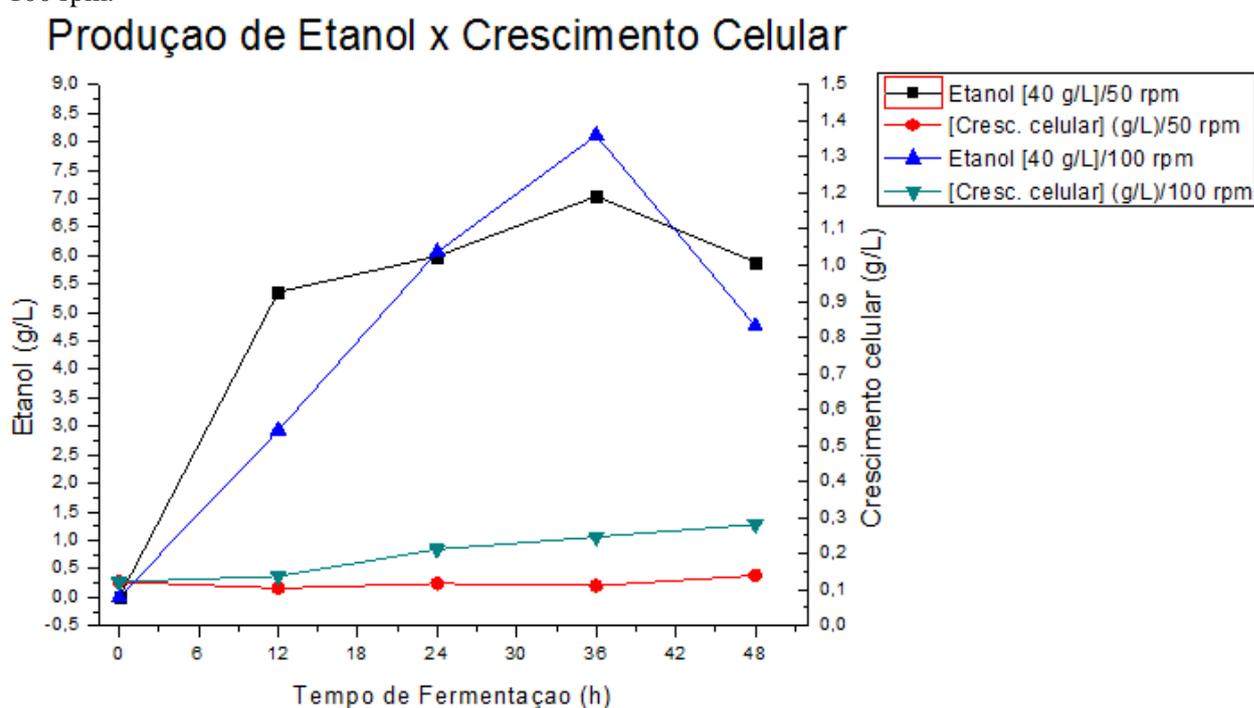


Na Figura 17, está representada a produção de etanol por *S. cerevisiae* versus o crescimento da levedura no meio de cultura contendo o hidrolisado de sabugo de milho a 40 g/L de açúcares redutores.

Nela (Figura 17), pode ser observado que uma boa produção foi alcançada em 12 h de fermentação para o meio com agitação de 50 rpm, que foi de 5,36 g/L. Já, a maior produção de etanol se encontra no tempo de 36 h de fermentação para as duas velocidades de agitação. Em 50 rpm, foi obtido 7,04 g/L de etanol, e em 100 rpm, 8,11 g/L, havendo um decréscimo até o final da fermentação, não sendo, portanto, necessário prolongar o processo até 48 h.

A avaliação para o crescimento da levedura (Figura 17) mostrou um comportamento de leve crescimento, onde, pode ser observado que seu crescimento aumentou durante as 48 h de fermentação, tendo um pico de 1,28 g/L ao fim da fermentação no meio com agitação de 100 rpm. A avaliação da produção de etanol, também apresentada na Figura 17 indica que a melhor produção da levedura foi 8,11 g/L de etanol em 36 h de fermentação no meio agitado a 50 rpm; a melhor produção para o meio agitado a 100 rpm foi de 7,04 g/L de etanol também em 36 h de fermentação.

Figura 17 – Comportamento da Produção de etanol por *S. cerevisiae* e do seu crescimento celular no meio de cultura contendo o hidrolisado de sabugo de milho com 2,5% de H_2SO_4 , e aquecimento de 30 min. incubado a 30 °C durante 48 h no hidrolisado desintoxicado, com 50 e 100 rpm.



O pH do meio fermentado se manteve praticamente constante durante todo o período de fermentação (Tabela 9).

Tabela 9 – Comportamento do pH do meio de fermentação durante a produção de etanol por *S. cerevisiae* no meio de cultura contendo o hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 48 h no hidrolisado desintoxicado.

Tempo de fermentação (h)	pH (50 rpm)	pH (100 rpm)
0	7,26 ± 0,08	7,26 ± 0,08
12	6,74 ± 0,14	6,90 ± 0,12
24	7,12 ± 0,06	6,70 ± 0,08
36	6,40 ± 0,17	6,27 ± 0,15
48	6,06 ± 0,12	5,98 ± 0,13

5.2.3 Processo fermentativo completo utilizando o meio contendo o hidrolisado de sabugo de milho e incubação de 24 horas

Uma nova hidrólise ácida foi realizada com os melhores parâmetros selecionados nas análises anteriores, concentração de 2,5% de H₂SO₄, durante 30 min. de aquecimento. Os resultados obtidos da hidrólise ácida do sabugo de milho estão apresentados na Tabela 10. A hidrólise foi feita com o objetivo de liberar a concentração de 20 e 40 g/L de açúcares redutores. Portanto, houve necessidade de concentrar o hidrolisado, por meio de evaporação, até essas concentrações para, em seguida, ser feito o processo fermentativo com essas concentrações.

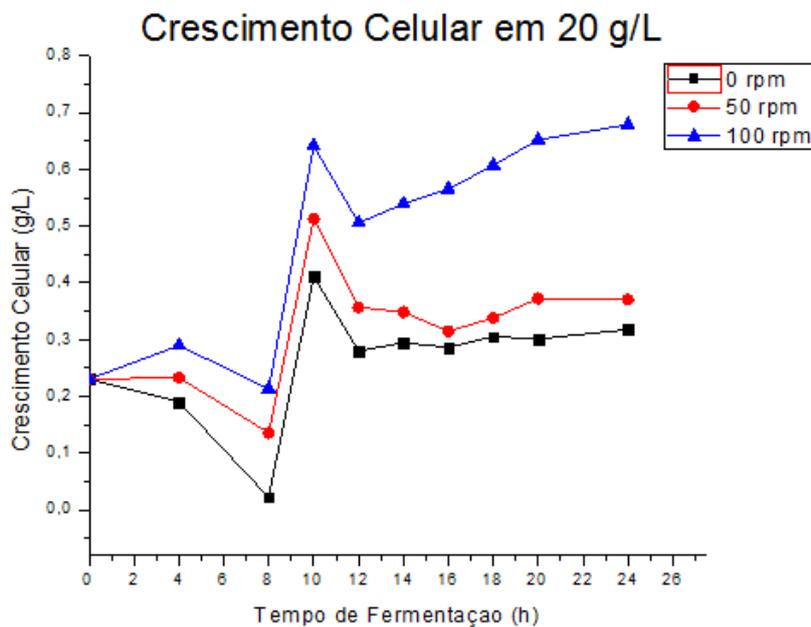
Tabela 10 – Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores (g/L) e compostos fenólicos (ác. vanílico g/L) liberados durante a hidrólise ácida com 2,5% de H₂SO₄, e com aquecimento de 30 min., antes e após desintoxicação.

Análise	20 g/L		40 g/L	
	Hidrolisados	Desintoxicados	Hidrolisados	Desintoxicados
Açúcares Totais (g/L)	31,01 ± 2,36	30,29 ± 0,43	54,08 ± 2,76	51,26 ± 2,01
Açúcares Redutores (g/L)	21,46 ± 0,84	21,73 ± 0,76	41,20 ± 1,15	40,42 ± 1,74
Compostos Fenólicos (ác. vanílico g/L)	0,71 ± 0,02	0,44 ± 0,02	1,41 ± 0,10	1,22 ± 0,11

A partir da hidrólise foi iniciado o processo fermentativo com 0,23 g/L da levedura, e amostras foram retiradas a cada 4 h na fase lag e a cada 2 h na fase log para a determinação do crescimento celular, pH do meio fermentado, produção de etanol, açúcares redutores e compostos fenólicos remanescentes, em um período total de 24 h.

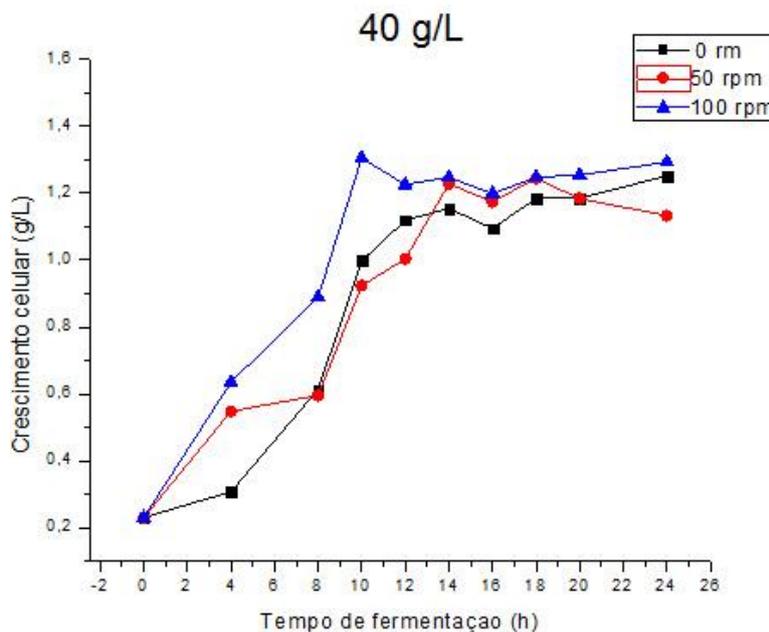
O comportamento do crescimento celular da levedura durante a produção de etanol no meio de cultura contendo hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 24 h contendo a concentração de 20 g/L de AR no hidrolisado desintoxicado foi maior na incubação com agitação de 100 rpm, obtendo seu pico de crescimento de 0,64 g/L em 10 h de fermentação, isso pode ser observado na Figura 18. Para as rotações de 0 e 50 rpm o maior crescimento também foi revelado em 10 h de fermentação, com 0,41 e 0,51 g/L respectivamente (Figura 18).

Figura 18 – Crescimento da levedura *S. cerevisiae* no meio hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30°C durante 24 h no hidrolisado desintoxicado, contendo 20 g/L de AR.



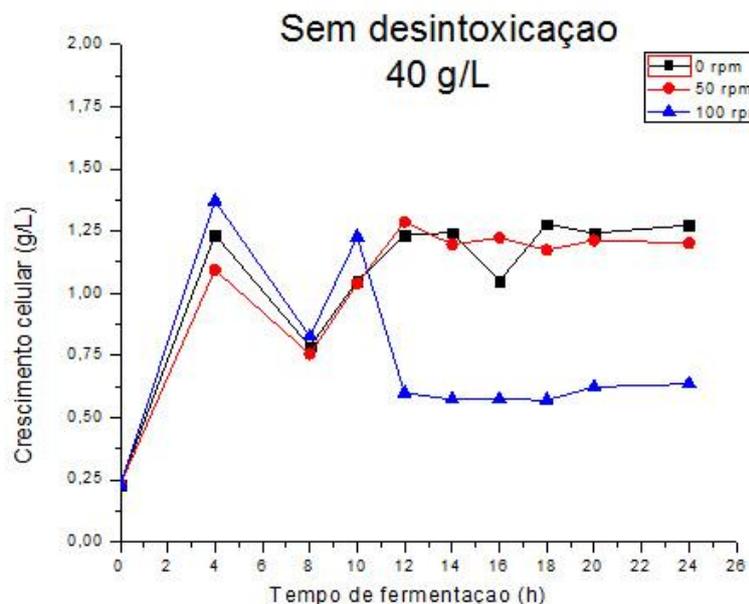
No meio de cultura hidrolisado desintoxicado contendo a concentração de açúcares redutores de 40 g/L o maior crescimento celular também se deu em 100 rpm, em 10 h de fermentação, com o crescimento de 1,30 g/L, como apresentado na Figura 19. Esta mesma Figura também mostra que na rotação de 0 rpm o maior crescimento foi em 18h de fermentação, com 1,24 g/L e em 50 rpm, o maior crescimento se deu em 24 h de fermentação com 1,25 g/L de células da levedura.

Figura 19 – Crescimento da levedura *S. cerevisiae* no meio hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30°C durante 24 h no hidrolisado desintoxicado, contendo 40 g/L de AR.



O crescimento celular também foi analisado em uma fermentação com a concentração inicial de 40 g/L de açúcares redutores no meio de cultura hidrolisado sem o processo de desintoxicação (Figura 20). O maior desenvolvimento celular se deu no tempo de 4 h para a rotação de 100 rpm, com 1,36 g/L. Para o meio hidrolisado não desintoxicado incubado sem rotação (0 rpm) o maior crescimento celular foi apresentado em 18 h de fermentação sendo 1,24 g/L. Na rotação de 50 rpm o pico de crescimento foi em 12 h de fermentação com 1,22 g/L, o crescimento da levedura no meio sem desintoxicação está apresentado na Figura 20.

Figura 20 – Crescimento da levedura *S. cerevisiae* no meio hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30°C durante 24 h no hidrolisado não desintoxicado, contendo 40 g/L de AR.



O crescimento celular da levedura foi similar nos meios de fermentação com concentração inicial de 40 g/L de AR com o processo de desintoxicação (Figura 19) e sem o processo de desintoxicação (Figura 20), apresentando seus melhores resultados entre 1,30 g/L de células e 1,36 g/L de células da levedura.

Estes resultados de crescimento celular da levedura mostram que a levedura priorizou seu desenvolvimento no lugar da produção de etanol ou pode indicar também que, na ausência ou escassez de glicose no meio de cultura (hidrolisado), começou a utilizar o etanol formado para a sua sobrevivência (LAVOVÁ et al., 2014). A produção de etanol nos meios fermentados está apresentada nas Figuras 21, 22 e 23.

A produção de etanol pela levedura apresentou melhores resultados nos meios sem agitação para as concentrações iniciais de 20 e 40 g/L de AR (Figuras 21 e 22). Para o meio contendo inicialmente 20 g/L de AR a maior produção se deu em 18 h de fermentação, 3,22 g/L de etanol a 0 rpm (Figura 21). Para o meio contendo 40 g/L de AR iniciais a maior produção também foi apresentada em 18 h de fermentação, 2,61 g/L de etanol a 0 rpm (Figura 22).

Na Figura 21 também esta apresentada a produção de etanol para o meio fermentado com rotação de 50 rpm, onde, a maior produção do meio foi de 2,05 g/L de etanol em 10 h de fermentação; para o meio fermentado a 100 rpm a maior produção foi de 1,62 g/L de etanol em 18 h de fermentação.

Figura 21 – Produção de etanol por *S. cerevisiae* no meio hidrolisado desintoxicado de sabugo de milho com 2,5% de H_2SO_4 , e aquecimento de 30 min., com 20 g/L de AR, incubado a 30 °C durante 24 h.

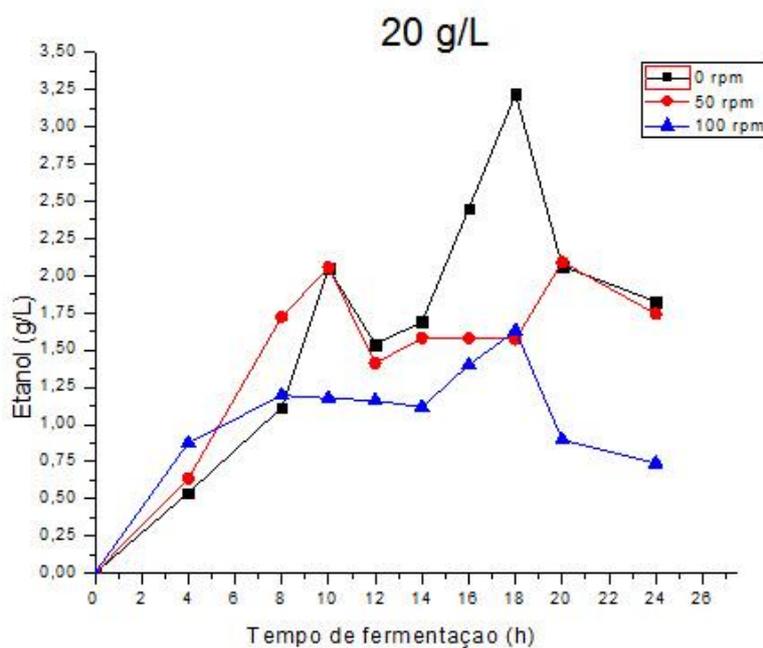
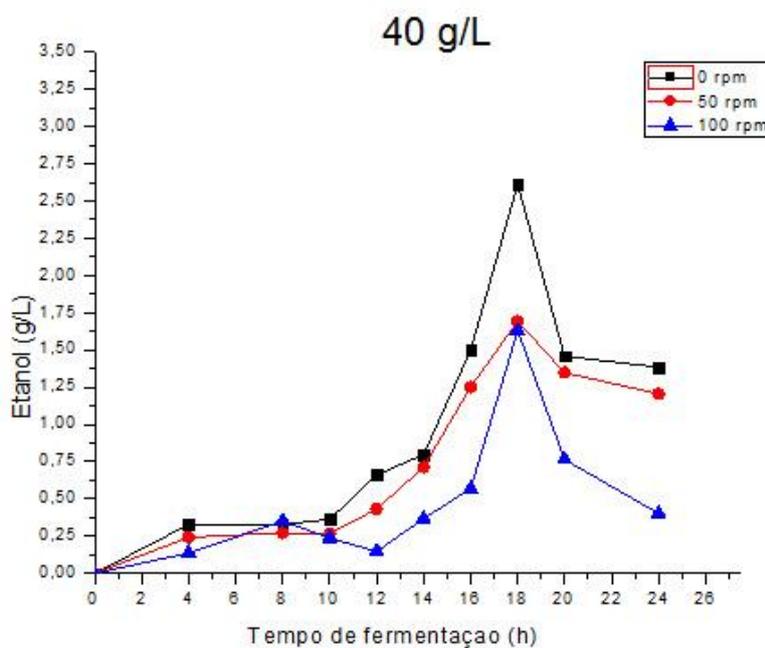


Figura 22 – Produção de etanol por *S. cerevisiae* no meio hidrolisado desintoxicado de sabugo de milho com 2,5% de H_2SO_4 e aquecimento de 30 min., com 40 g/L, incubado a 30 °C durante 24 h.

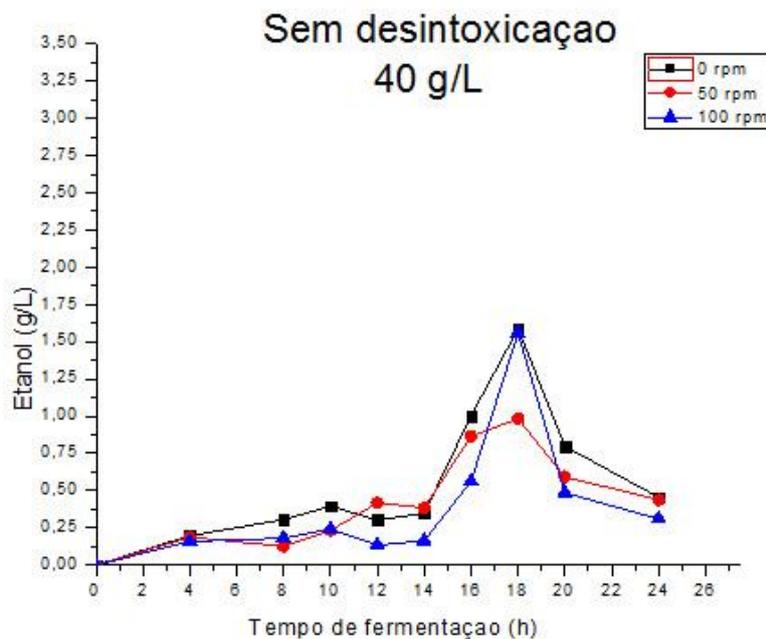


Na Figura 22 também estão apresentados os resultados da produção de etanol pela levedura durante a fermentação com agitação no meio hidrolisado, em 50 rpm e

100 rpm, a maior produção de etanol ocorreu em 18 h de fermentação; 1,69 g/L de etanol para 50 rpm e 2,12 g/L de etanol em 100 rpm.

Foi avaliada a produção de etanol em um meio hidrolisado fermentado sem o processo de desintoxicação (Figura 23).

Figura 23 – Produção de etanol por *S. cerevisiae* no meio hidrolisado não desintoxicado de sabugo de milho com 2,5% de H₂SO₄ e aquecimento de 30 min., com 40 g/L, incubado a 30 °C durante 24 h.



Na Figura 23 é possível observar que a levedura produziu etanol neste meio, entretanto, uma concentração menor do que nos meios desintoxicados (1,98 g/L de etanol no meio sem desintoxicação para 2,61 g/L de etanol no meio desintoxicado, com 40 g/L de AR iniciais). Através da avaliação do crescimento da levedura (Figura 20), foi possível verificar que ela se desenvolveu neste meio, não desintoxicado, tanto quanto nos meios que passaram pelo processo de desintoxicação, porém, não produziu tanto etanol quanto nos desintoxicados.

As concentrações de açúcares redutores remanescentes no meio de cultura hidrolisado fermentado foram analisadas e estão apresentadas na Figura 24, 25 e 26.

Figura 24 – Concentrações de açúcares redutores em g/L remanescentes do processo de fermentação completo com aquecimento de 30 min. no hidrolisado desintoxicado com 2,5% de H_2SO_4 e 20 g/L de AR.

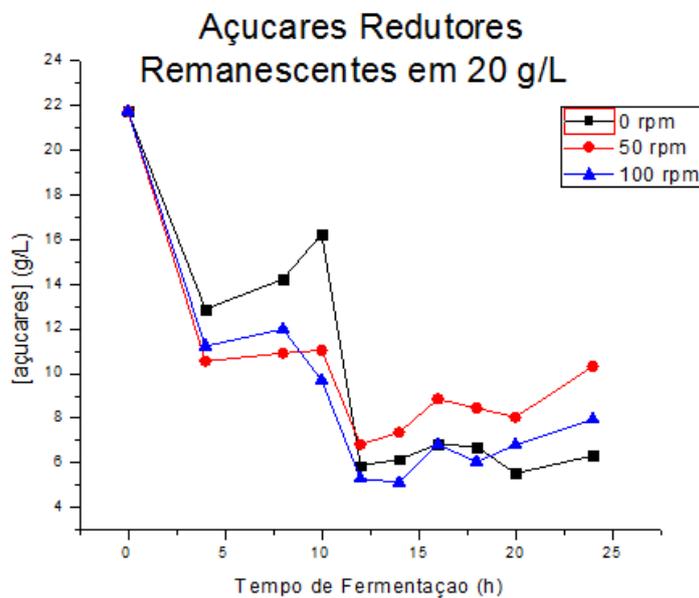


Figura 25 – Concentrações de açúcares redutores em g/L remanescentes do processo de fermentação completo com aquecimento de 30 min. no hidrolisado desintoxicado com 2,5% de H_2SO_4 e 40 g/L de AR.

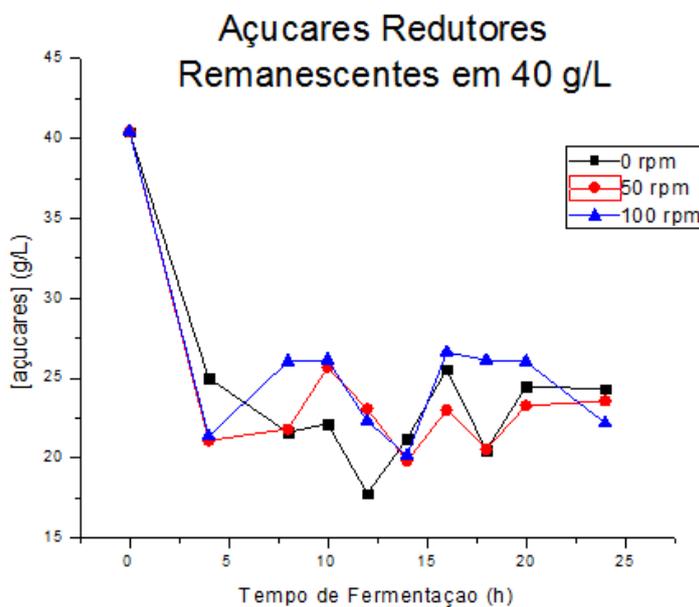
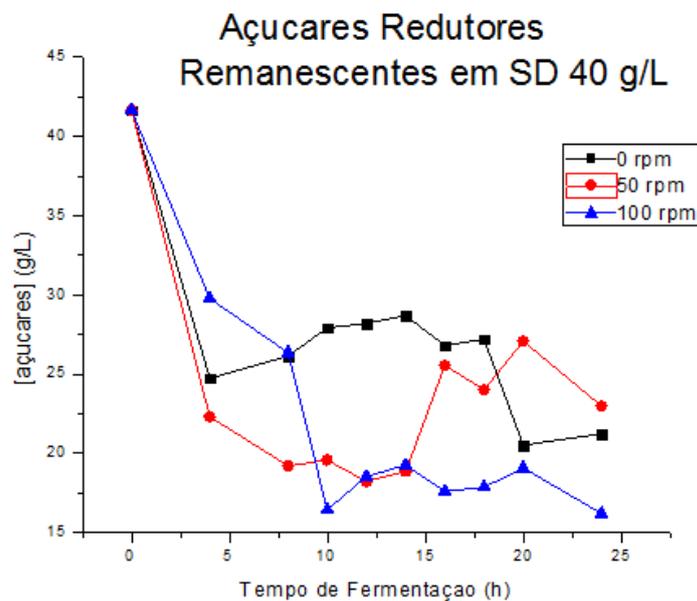


Figura 26 – Concentrações de açúcares redutores em g/L remanescentes do processo de fermentação completo com aquecimento de 30 min. no hidrolisado não desintoxicado com 2,5% de H_2SO_4 e 40 g/L de AR.



Os compostos fenólicos resultantes do meio de fermentação foram analisados, e estão apresentados nas figuras 27, 28 e 29.

Figura 27 – Valores remanescentes de compostos fenólicos em concentração de ácido vanílico em g/L do processo de fermentação do meio hidrolisado desintoxicado com 2,5% de H_2SO_4 e 20 g/L de AR.

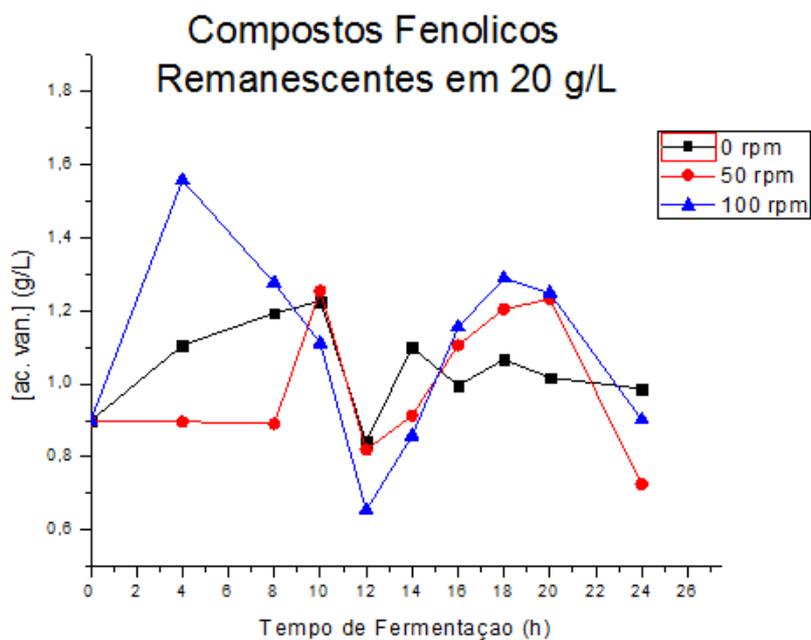


Figura 28 – Valores remanescentes de compostos fenólicos em concentração de ácido vanílico em g/L do processo de fermentação do meio hidrolisado desintoxicado com 2,5% de H_2SO_4 e 40 g/L de AR.

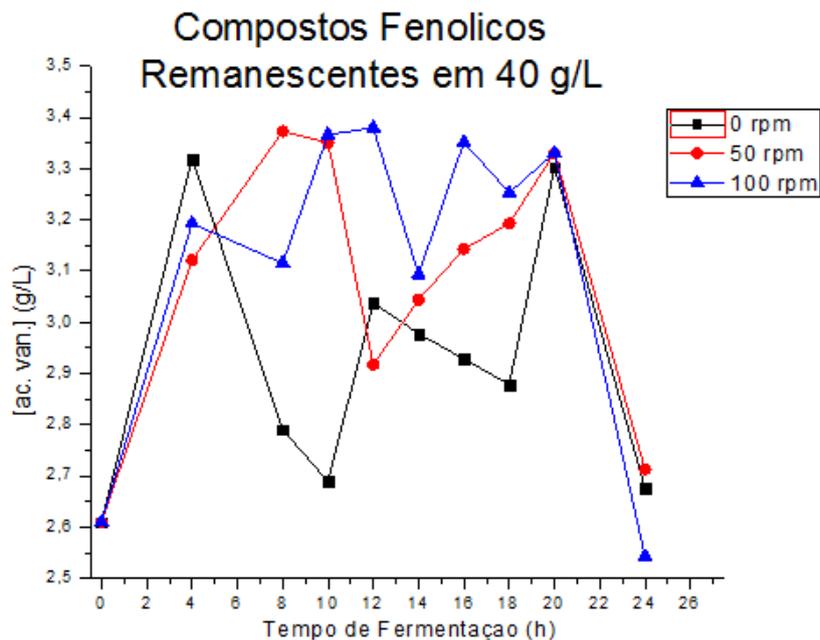
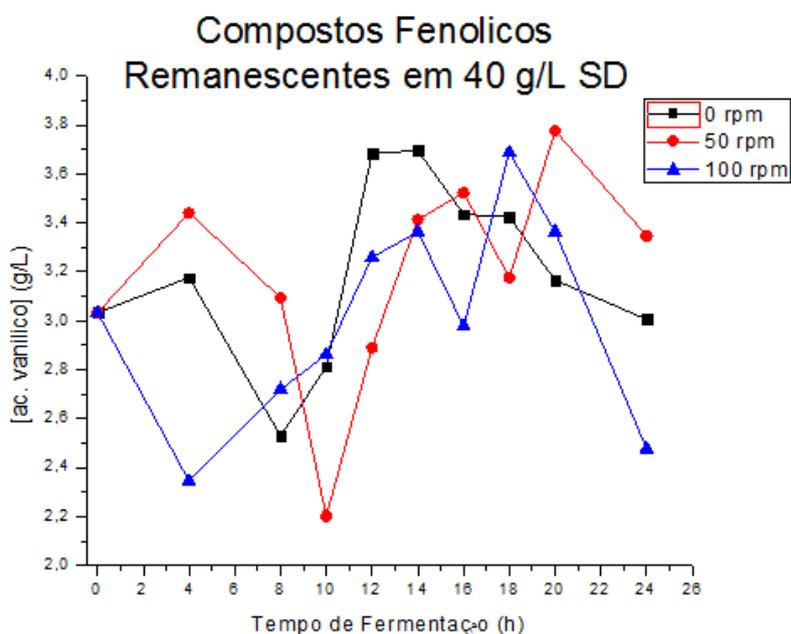


Figura 29 – Valores remanescentes de compostos fenólicos em concentração de ácido vanílico em g/L do processo de fermentação do meio hidrolisado não desintoxicado com 2,5% de H_2SO_4 e 40 g/L de AR.



O pH do meio hidrolisado desintoxicado e do meio não desintoxicado apresentou pouca variação. O meio inicial estava neutralizado ($pH = 7$), com o passar do tempo de fermentação, o crescimento celular e a produção de etanol, o pH do meio

variou até chegar a seu menor valor de 5,10, mostrado na Tabela 12, onde foi avaliado o pH do meio desintoxicado que inicialmente apresentava 40 g/L.

O aumento da concentração celular libera ácidos orgânicos devido à absorção dos açúcares fermentescíveis pelas leveduras formando estes ácidos e, conseqüentemente, reduz o pH do meio de cultura (TRINCA, 2014). As tabelas 11, 12 e 13 mostram essa variação de pH do meio hidrolisado desintoxicado que iniciou a fermentação com 20 g/L de açúcares redutores (Tabela 11) e dos meios contendo os hidrolisado desintoxicado (Tabela 12) e não desintoxicado (Tabela 13) contendo 40 g/L de AR.

Tabela 11 – Comportamento do pH do meio de fermentação contendo o hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 24 h no hidrolisado desintoxicado, com 20 g/L de AR.

Tempo de fermentação (h)	0 rpm	50 rpm	100 rpm
0	7,00	7,00	7,00
4	6,58	6,45	6,71
8	6,43	6,01	6,21
10	5,39	5,43	5,45
12	5,20	5,4	5,39
14	5,46	5,39	5,43
16	5,25	5,39	5,36
18	5,21	5,45	5,30
20	5,22	5,27	5,30
24	5,20	5,12	5,20

A Tabela 12 mostra a variação de pH do meio hidrolisado desintoxicado durante a fermentação de 24 h, que foi iniciado com uma concentração de 40 g/L de açúcares redutores.

Tabela 12 – Comportamento do pH do meio de fermentação contendo o hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 24 h no hidrolisado desintoxicado, com 40 g/L de AR.

Tempo de fermentação (h)	0 rpm	50 rpm	100 rpm
0	7,00	7,00	7,00
4	6,55	6,42	6,37
8	5,97	5,89	6,32
10	5,32	5,40	5,42
12	5,18	5,44	5,37
14	5,45	5,41	5,36
16	5,45	5,28	5,45
18	5,34	5,22	5,22
20	5,27	5,26	5,31
24	5,10	5,20	5,29

A Tabela 13 mostra a variação de pH do meio hidrolisado sem ser desintoxicado que iniciou a fermentação com 40 g/L de açúcares redutores.

Tabela 13 – Comportamento do pH do meio de fermentação contendo o hidrolisado de sabugo de milho incubado a 30 °C durante 24 h no hidrolisado não desintoxicado, com 40 g/L de AR.

Tempo de fermentação (h)	0 rpm	50 rpm	100 rpm
0	7,00	7,00	7,00
4	6,48	6,52	6,47
8	6,02	5,98	6,20
10	5,01	5,36	5,42
12	5,46	5,39	5,36
14	5,44	5,15	5,40
16	5,36	5,33	5,36
18	5,36	5,32	5,30
20	5,27	5,25	5,23
24	5,25	5,22	5,22

Todos os meios tiveram o pH reduzido durante a fermentação. Segundo Fu e Peiris (2008) o pH do meio é um bom indicador do andamento da fermentação; com o aumento da produção de CO₂, produção de ácido acético e ácidos orgânicos, o pH é reduzido, como visto nessa dissertação, onde o pH de 7 diminuiu até 5,10.

5.2.4 Processo fermentativo completo utilizando um meio contendo 40 e 60 g/L de glicose como meio padrão de comparação

O desempenho da levedura *S. cerevisiae* durante a fermentação alcoólica foi avaliado utilizando um meio sintético acrescido de glicose como fonte de carbono nas concentrações de 40 e 60 g/L durante um período de incubação de 18 h. Para isto, amostras foram retiradas a cada hora e determinado o pH do meio, o crescimento da levedura e a produção de etanol a cada 1 h.

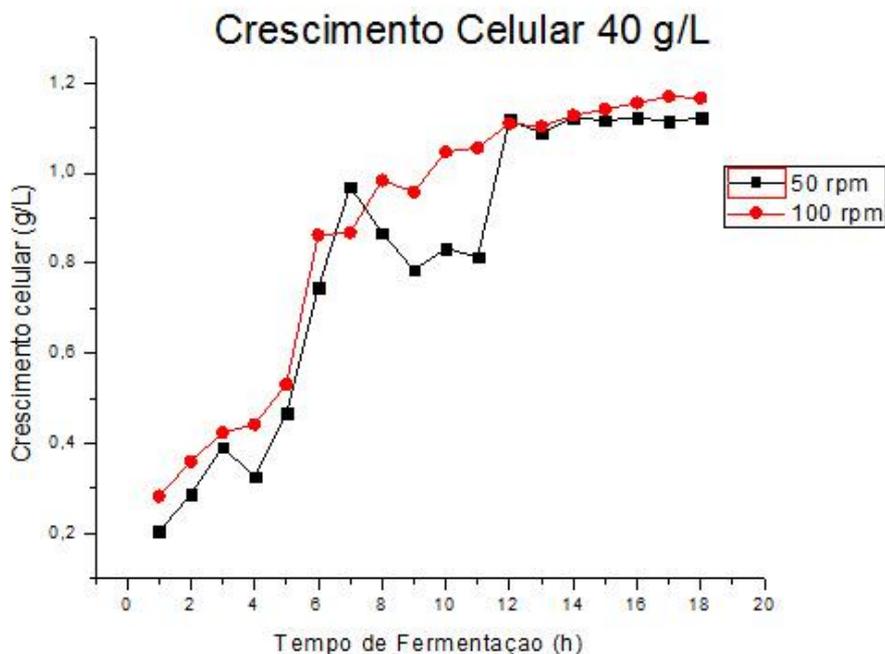
As alterações do pH estão apresentadas na Tabela 14, onde pode-se observar que houve decréscimo no pH do meio conforme houve o desenvolvimento da levedura (Figuras 29 e 30) ou produção de etanol (Figuras 32 e 33). Nesta Tabela 14 também é possível observar que a agitação do meio de cultura pouco influenciou o pH, uma vez que, os valores determinados foram muito similares.

Tabela 14 – Determinação do pH do meio sintético de fermentação contendo as concentrações de 40 e 60 g/L de glicose em uma fermentação de 18 horas.

Tempo (hora)	pH – 40 g/L		pH – 60 g/L	
	50 rpm	100 rpm	50 rpm	100 rpm
0	6,95	7,02	7,10	6,98
1	5,75	5,65	5,64	5,78
2	5,28	5,60	5,29	5,65
3	4,84	4,78	4,79	4,81
4	4,61	4,45	4,64	4,46
5	4,20	4,28	4,16	4,12
6	3,88	3,67	3,99	3,79
7	3,76	3,47	3,67	3,58
8	3,63	3,42	3,58	3,45
9	3,55	3,40	3,56	3,42
10	3,41	3,31	3,37	3,34
11	3,43	3,36	3,40	3,36
12	3,45	3,23	3,67	3,27
13	3,32	3,27	3,30	3,24
14	3,10	3,20	3,26	3,28
15	3,19	3,20	3,24	3,31
16	3,19	3,22	3,26	3,26
17	3,25	3,31	3,32	3,36
18	3,26	3,30	3,28	3,27

As Figuras 30 e 31 mostram o comportamento do crescimento celular da levedura nas duas concentrações de AR iniciais estudadas e pode ser observado que na medida em que transcorre o tempo de fermentação o crescimento celular aumenta e a produção de etanol pela levedura nos dois meios sintéticos acompanhou este mesmo crescimento (Figura 32 e Figura 33).

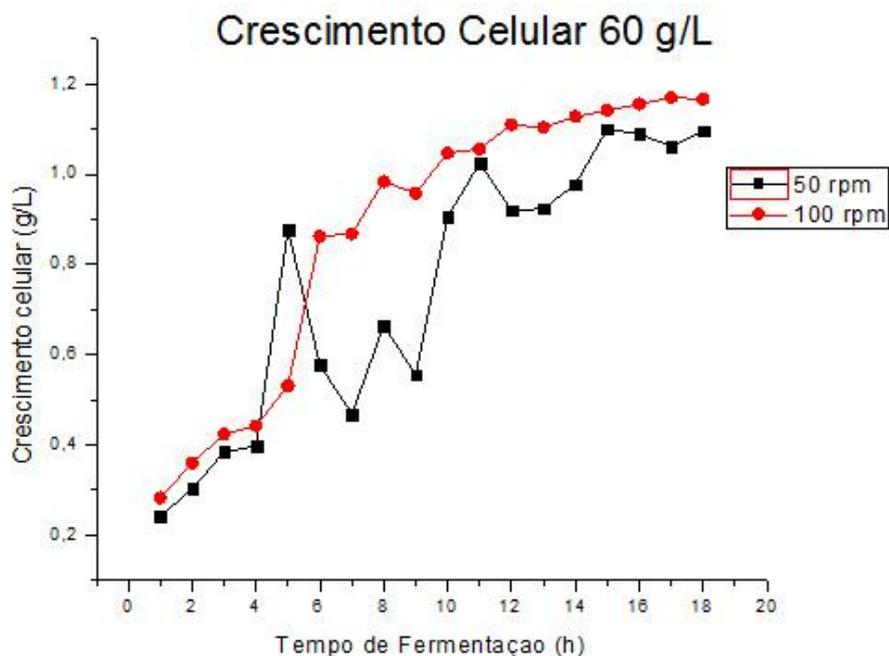
Figura 30 – Crescimento celular da levedura *S. crevisiae* em meio sintético contendo 40 g/L de glicose.



Por meio da Figura 30 é possível verificar que no meio com concentração inicial de 40 g/L de AR, há o crescimento da levedura e que o desenvolvimento da levedura no meio com rotação de 100 rpm se comportou de forma mais uniforme que o com 50 rpm. No meio fermentado com rotação de 100 rpm a maior produção celular da levedura foi de 1,16 g/L de células em 17 h de fermentação. Para o meio com rotação de 50 rpm o maior crescimento foi de 1,12 g/L de células em 16 h de fermentação (Figura 30).

Na Figura 31, onde está apresentado o crescimento celular no meio contendo inicialmente 60 g/L de AR, o maior desenvolvimento da levedura se deu em 18 h de fermentação com o meio sofrendo rotação de 100 rpm, em 18 h de fermentação, foi 1,13 g/L de células. Para o meio que sofreu rotação de 50 rpm, o maior crescimento aconteceu em 15 h de fermentação, sendo 1,10 g/L de células da levedura.

Figura 31 – Crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* em meio sintético contendo 60 g/L de glicose.



Na Figura 32, está representada a produção de etanol por *S. cerevisiae* no meio sintético contendo 40 g/L de glicose e na Figura 33 está representada a produção de etanol pela levedura no meio sintético de glicose com 60 g/L. Nelas, pode ser observado que a produção foi aumentando até o final da fermentação, com exceção no meio sintético de 60 g/L que em 18 h de fermentação a 100 rpm houve decréscimo na concentração de etanol.

Na figura 32 é possível verificar que a maior produção de etanol no meio fermentado com a concentração inicial de 40 g/L de AR se deu em 18 h de fermentação, com a rotação de 50 rpm, onde a produção foi de 17,28 g/L de etanol. Para o meio fermentado com rotação de 100 rpm, a maior produção se deu em 17 h de fermentação, gerando 13,65 g/L de etanol (Figura 32).

Figura 32 – Produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* em meio sintético contendo 40 g/L de glicose.

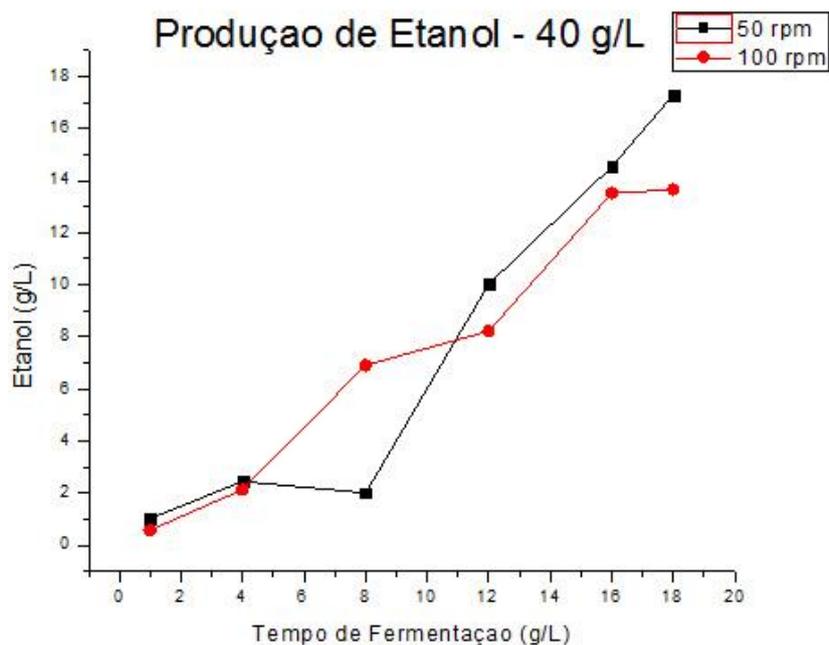
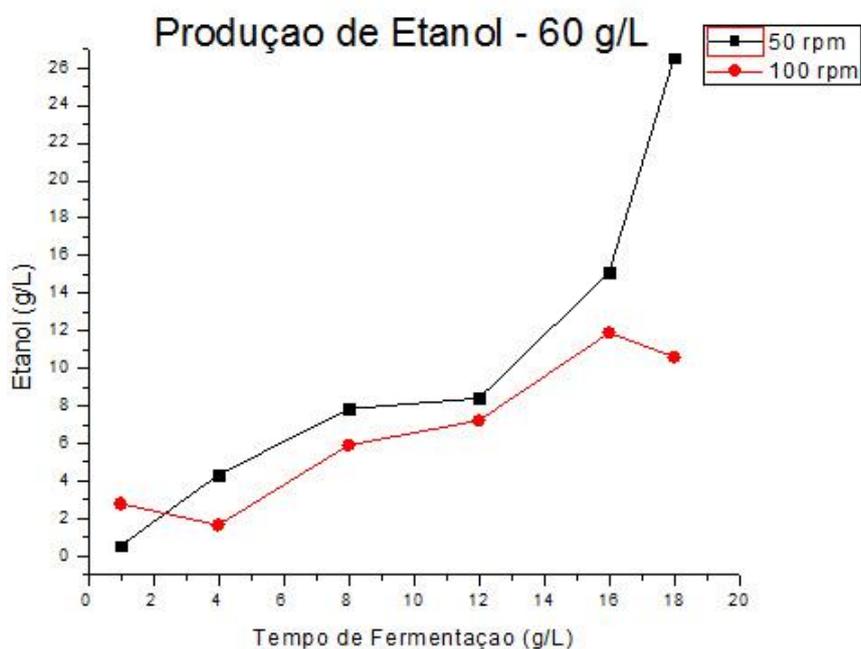


Figura 33 – Produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* em meio sintético contendo 60 g/L de glicose.



Na figura 33 está apresentado o meio fermentado com concentração inicial de 60 g/L de AR, onde, a maior produção também ocorreu em 18 h de fermentação com a rotação de 50 rpm, produzindo 26,55 g/L de etanol. A maior produção de etanol no meio fermentado com rotação de 100 rpm foi de 11,88 g/L de etanol também em 18 h de fermentação (Figura 33).

6. CONCLUSÕES

- O sabugo de milho se mostrou um bom substrato para a produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602.
- A hidrólise ácida do sabugo de milho utilizando diferentes concentrações de ácido sulfúrico (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0%), indicou que a melhor concentração foi a de 2,5%.
- Os hidrolisados foram submetidos a diferentes tempos de aquecimento em autoclave (15 e 30 min.) e o tempo de 30 min. se mostrou mais eficiente para a realização da fermentação.
- O efeito da desintoxicação nos hidrolisados para a remoção de compostos inibidores da fermentação produzidos durante a hidrólise nos diferentes tempos de aquecimento apresentou bom desempenho. A concentração de compostos fenólicos diminuiu após esta etapa.
- O meio sintético contendo glicose apresentou crescimento e produção de etanol similar nas concentrações de 40 e 60 g/L de AR. A maior produção de etanol se deu em 18 h de fermentação a 50 rpm, onde, foi obtido 17 g/L e 26 g/L de etanol para 40 e 60 g/L de AR, respectivamente.
- A avaliação da produção de etanol pela levedura utilizando o meio hidrolisado nas concentrações de 20, 40, e 60 g/L de AR, indicou a presença de etanol nas amostras, a maior produção dentre as concentrações de AR utilizadas foi a 40 g/L, 8,11 g/L de etanol em 36 h de fermentação a 100 rpm.
- O efeito de diferentes velocidades de agitação (0, 50 e 100 rpm) nas condições selecionadas para produção de etanol pela levedura promoveu a produção de etanol nas amostras, a maior produção se deu na agitação de 100 rpm.
- A fermentação do hidrolisado desintoxicado pela levedura apresentou produção de etanol, gerou 8,11 g/L de etanol em 40 g/L de AR em 36 h de fermentação a 100 rpm.
- A fermentação do hidrolisado não desintoxicado pela levedura apresentou produção de etanol, em 40 g/L de AR, 1,58 g/L de etanol a 18 h de fermentação a 0 rpm.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application, **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. p. 106. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Unioeste, Toledo, 2010.

AGUILAR R. et al., Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, n. 4, p. 309-318, 2002.

ALBANO, M. **Comparação da produção de celulasas e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido**. 2012. p 82. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2012.

ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; LIDEN, G.; GORWAGRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

ALZATE, C. A. C.; TORO, O. J. S. Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. **Energy**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 2447–2459, 2006.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v.7, p.163-173, 2014.

ARENAS T. L.; RATHI P.; RAMIREZ-JIMENEZ R.; SALES-CRUZ M. Factors affecting the acid pretreatment of lignocellulosic biomass: batch and continuous process. In: Pierucci S, Ferraris B, editors. 2010. In: 20th European symposium on computer aided process engineering-ESCAPE20; 2010.

ASK M, BETTIGA M, MAPELLI V, OLSSON L. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Biofuels**, v. 6, p. 22, 2013.

BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res**, v.8, n.7, p.1155-63, 2008.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 326–338, 2001.

BEHERA, S.; KAR, S.; MOHANTY, R. C.; RAY, R. C. Comparative study of bio-ethanol 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.

BETANCUR, G. J. V. **Avanços em biotecnologia de hemicelulose para produção de etanol por *Picchia stipitis***. 2005. p. 123. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. **Progress in Polymer Science**, v. 19, n. 5, p. 797–841, 1994.

CAMPOS, F. M; FIGUEIREDO, A. R; HOGG, T. A; COUTO, J. A. Effect of phenolic acids on glucose and organic acid metabolism by lactic acid bacteria from wine. **Wine Microbiology**, v. 26, p. 409–14, 2009.

CANILHA, L. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v. 44, p. 48-54, 2010.

CANTARELLA, M. et al. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. **Process Biochemistry**. v. 39, n. 11, p. 1533-1542, 2004.

CAO, N. J.; KRISHMAN, M. S.; DU, J. X.; GONG, C. S.; HO, N. W. Y.; CHEN, Z. D.; TSAO, G. T. Ethanol production from corn cob pretreated by the ammonia steeping process using genetically engineered yeast. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 9, p. 1013-1018. 1996.

CARDONA C. A.; QUINTERO J. A.; PAZ I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2009.

CARVALHO, G. B. M. **Utilização de carvão ativo, resinas e terra diatomácea para o tratamento do hidrolisado de eucalipto na produção biotecnológica de xilitol**, 2005. p. 110. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

CARVALHO, L. C. et al. Cana-de-açúcar e álcool combustível: histórico, sustentabilidade e segurança energética. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 530-542, 2013.

CARVALHO, L. L. M. **Estudo da hidrólise e fermentação dos resíduos de milho (*Zea mays*) para produção de etanol de segunda geração**. 2016. p. 68, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Alagoas, Maceió, 2016.

CASCIATORI, F. P. **Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido: ampliação de escala de biorreatores de leito fixo**. 2015. p. 177. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, 2015.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHANDEL, A. K.; RAJEEV, K.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947-1950, 2007.

CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. Bernardes MADS. 2011. Biofuel production recent developments and prospects (Chapter 10). 2011

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

CHIARAMONTI D.; PRUSSI M.; FERRERO S.; ORIANI L.; OTTONELLO P.; TORRE P.; CHERCHI F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass Bioenergy**, v. 12, n. 46, p. 25–35. 2012.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos**. 2015. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 25 mar. 2017.

CORTEZ, L. A. et al. **Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P&D para Produtividade e Sustentabilidade**. 1ª Ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2010. p. 992.

DAGNINO, E.P.; CHAMORRO, E.R.; ROMANO, S.D.; FELISSIA, F.E.; AREA, M. C. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p.363-368. 2012.

DELGENES, J.; MOLETTA, R; NAVARRO J. Effect of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 3, p. 220–225, 1996.

DEMIRBAS, A. Biorefineries: current activities and future developments. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 11, p. 2782-2801, 2009.

DEMIRBAS, A. Potential applications of renewable energy sources, biomass combustion problems in boiler power systems and combustion related environmental issues. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 171- 192, 2005a.

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

DURÁN, N.; ZAMORA, P. P.; REYES, J. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases: efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v. 21, n. 2 ,p. 140-143, 1998.

EL-ZAWAWY, W. K., IBRAHIM, M. M., ABDEL-FATTAH, Y. R., SOLIMAN, N. A., MAHMOUD, M. M. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydr. Polym**, v. 84, p. 865–871, 2011.

EPE – Empresa de Pesquisa Energética. **Análise de conjuntura dos biocombustíveis:** boletins periódicos. 2016. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/Petroleo/Paginas/PaineldeBiocombust%20%ADveis%E2%80%93%93Boletinsdean%20%ADlisedeconjuntura.aspx>> Acesso em: 28 abr. 2017.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Análise dos parâmetros cinéticos para produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando fermentação submersa. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-41, 2009.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984. p. 613.

FOLEY, K. M.; VANDER-HOOVEN, D. I. B. Properties and industrial uses of corncobs. In: POMERANZ, Y.; MUNCK L. Cereals – a renewable resource. The American Association of Cereal Chemists. St. Paul, 1981.

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, 2008.

FURLAN, V. J. M. **Produção de bioetanol a partir de resíduos celulósicos da agroindústria do arroz**. 2009, p. 92. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **Holz Roh Werkst**, v. 57, n. 1, p. 191–202, 1999.

GOMES, M. A. **Destoxificação de hidrolisados lignocelulósicos visando à obtenção de etanol 2G**. 2015. p. 94. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, 2015.

GORSICH, S. W.; DIEN, B. S.; NICHOLS, N. N.; SLININGER, P. J.; LIU, Z. L.; SKORY, C. D. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 3, p. 339–49. 2006.

GUO, G. L.; CHEN, W. H.; CHEN, W. H.; MEN, L. C.; HWANG, W. S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6046–53. 2008.

GUTIÉRREZ-RIVERA, B. et al. Conversion efficiency of glucose/xylose mixtures for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV01 and *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 87, n. 2, p. 263-270, 2012.

HARMSSEN, P.; HUIJGEN, W.; BERMUDEZ-LOPEZ, L.; BAKKER R. **Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass**. 1ªEd. Wageningen: Food & Biobased Research. 2010.

HARTMANN, H.; ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Increase of anaerobic degradation of particulate organic matter in full-scale biogas plants by mechanical maceration. In: Mata-Alvarez, J., Tilche, A., Cecchi, F. (Eds), 1999. Proceedings of the Second International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes, Barcelona, 1999. v. 1, p. 129-136.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1 p. 10–18, 2009.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

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.

HON, D. N. S., SHIRASHI, N. **Wood and Cellulosic Chemistry**. 2^a Ed. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 8881.

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2013.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, n. 1, p. 103-112, 2016.

KARLSSON, O.; TORNIAINEN, P.; DAGBRO, O.; GRANLUND, K.; MOREN, T. Presence of watersoluble compounds in thermally modified wood: carbohydrates and furfurals. **Bioresources**, v. 7, n. 3, p. 3679–3689, 2012.

KARUNANITHY, C.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Influence of extruder temperature and screw speed on pretreatment of corn stover while varying enzymes and their ratios. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 162, p. 264–79, 2010.

KATAPODIS, P. et al. Purification and characterization of a thermostable intracellular β -xylosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2402-2409, 2006.

KAZIENKO, N. C. B.; **Gerenciamento de resíduos agroindustriais gerados na pré-limpeza de grãos de milho em Santa Fé del Paraná, Paraguai**. 2009. p. 23. TCC (Graduação em Engenharia Ambiental) – Faculdade Dinâmica de Cataratas, Foz do Iguaçu, 2009.

KIM, S. R.; PARK, Y. C.; JIN, Y. S.; SEO, J. H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* forenhanced xylose metabolism. **Biotechnology Advances**, v.31, p.851-861, 2013.

KLEINGESINDS, E. K. **Avaliação da hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado com ácido diluído e surfactante para a obtenção de bioetanol**. 2017. p. 92. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

KOHNKE T. Adsorption of xylans on cellulosic fibres [Ph.D. thesis]. Goteborg, Sweden: Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology; 2010

LAL, R. Soil Carbon Sequestration Impacts on Global Climate Change and Food Security. **Science**, v. 304, n. 5677, p. 1623-1627, 2004.

LARSSON, S.; CASSLAND, P.; JONSSON, L. J. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by heterologous expression of laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67:p. 1163–70, 2001.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N. O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3, p. 151–159, 199b.

LAVOVÁ, B.; URMINSKÁ, D.; SILLEROVÁ, S. Diauxic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, n. 1, p. 122-123, 2014.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.

LEMOIS, J. L. S. **Estudo da produção de xilanases por *aspergillus awamori* em bagaço de cana**. 2001. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

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

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627–642, 2006.

LU, H.; REN, M.; ZHANG, M.; CHEN, Y. Pretreatment of Corn Stover Using Supercritical CO₂ with Water-Ethanol as Co-solvent. **Biotechnology and Bioengineering - Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 5, p. 551-557. 2013.

LU, X. et al. Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. **Chem. Eng. Technol.**, v. 30, n. 7, p. 938-944, 2007.

MAKAWI, S. Z. A.; TAHA, M. I.; ZAKARIA, B. A.; SIDDIQ, B.; MAHMUD, H.; ELHUSSEIN, A. R. M.; KARIEM, E. A. G. Identification and quantification of 5-hydroxymethyl furfural HMF in some sugar-containing food products by HPLC. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, p. 1391–6, 2009.

MARTÍNEZ, A. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 195-204, 2005.

MELO, S. R. F.; **Atividades biológicas de xilana de sabugo de milho**. 2010. p. 84. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

MENDES, C. V. et al. Integrated bioconversion of pulp and paper primary sludge to second generation bioethanol using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602. **Bioresource Technology**, v. 220, n. 1, p. 161-167, 2016.

MEYER, P.A., TEWS, I.J., MAGNUSON, J.K., KAROGIOSIS, S.A., JONES, S.B. Techno-economic analysis of corn stover fungal fermentation to ethanol. **Applied Energy**, v.111, p. 657-668. 2013.

MICHELIN, M.; XIMENES, E.; POLIZELI, M. L. T. M.; LADISCH, M. R. Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities. **Bioresource Technology**, v. 199, n. 1, p. 275–278, 2016.

MITCHELL, V. D.; TAYLOR, C. M.; BAUER, S. Comprehensive analysis of monomeric phenolics in dilute acid plant hydrolysates. **Bioenergy Resource**, v.7, p. 654–669, 2014.

MODIG, T; LIDÉN, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochem. J.**, v. 363, pt. 3, p. 769–776, 2002.

MONSALVE, J. F.; PEREZ, V. I. M.; COLORADO, A. A. R. Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y almidón de yuca, **Dyna**, v. 73, n. 150, p. 21-27, 2006.

MOREIRA, J. R. Obtenção de etanol a partir de material celulósico. In ROSILLOCALE, BAJAY E ROTHMAN (org) “Uso da Biomassa para Produção de Energia na Indústria Brasileira”. ISBN 85-268-0685-8. Campinas, São Paulo. Editora da UNICAMP, 2005.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol**, v. 96, n. 6, p. 673-686. 2005.

MTUI, G. Y. S. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 8, p. 1398–1415, 2009.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production-R1. **Biotechnonology Advances**, v. 28, n. 6, p. 817-830, 2010.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004b.

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

NEVOIGT, E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 72, n. 3, p. 379-412, 2008.

NIELSEN et al. **Biomass Supply Chains for Bioenergy and Biorefining**. Denmark: Elsevier, 2016. p. 385-392.

NOGUEIRA, A.; GUYOT, S.; MARNET, N.; LEQUERE, J. M.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G. Effect of alcoholic fermentation in the content of phenilic compounds in cider processing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1025–32, 2008.

- NUGROHO, R. H.; YOSHIKAWA, A. K.; SHIMIZU, H. Metabolomic analysis of acid stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biosci Bioeng**, v. 120, n. 4, p. 396-404, 2015.
- OFORI-BOATENG, C.; LEE, K. T. An oil palm-based biorefinery concept for cellulosic ethanol and phytochemicals production: Sustainability evaluation using exergetic life cycle assessment. **Applied Thermal Engineering**, v. 62, n. 1, p. 90-104, 2014.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.
- OLIVEIRA V. S. NETO A. A. M. Effect of Time and Temperature in the Alkaline Delignification on the cellulose hydrolysis. In: SINAFERM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caxias do Sul, 2011.
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.
- PACHECO, T. F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? **Circular técnica Embrapa**, Brasília, n. 4, p. 6, abr. 2011. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886571/1/CITE04.pdf>> Acesso em: 12 abr. 2017.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.
- PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 20-31, 2011.
- PEREIRA, Jr. N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. v. 2. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Series on Biotechnology - UFRJ, 2008. p. 45.
- PEREIRA, S. C.; MAEHARA, L.; MACHADO, C. M. M.; FARINAS, C. S. **Biotechnology for Biofuels**, n. 8, p. 44, 2015.
- PÉREZ, S.; SAMAIN, D. Structure and engineering of celluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v. 64, p. 25-116. 2010.
- PRETO, E. V.; MORTOZA, G. L. **Geração de Energia Elétrica Utilizando Biomassa**. 2010. TCC (Graduação em Engenharia Elétrica) – Universidade de Brasília, Faculdade de Tecnologia, Brasília, 2010.
- RABEMANOLONTSOA, S.; SAKA, H. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 83-91, 2016.
- RAMOS, L. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

- RAMOS, R. R. F. **Desenvolvimento de compósitos de polipropileno (PP) com sabugo de milho (SM) provenientes de resíduos agrícolas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal da Paraíba, 2013.
- RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 92–102, 2016.
- RENDEIRO, G. et al. **Combustão e Gaseificação da Biomassa Sólida: Soluções Energéticas para a Amazônia**. 1ª ed. Brasília: Ministério de Minas e Energia, 2008. p. 52-63.
- ROCHA, M. S. R. S.; SILVA, M. C. S.; PIMENTEL, W. R. O.; ALMEIDA, R. M. R. G. Pré-tratamento ácido dos resíduos de milho para produção de etanol de segunda geração. **Engevista**, v. 18, n. 2, p. 412-423, 2016.
- 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.
- RODRÍGUEZ-CHONG, A. et al. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 2, p. 143-152, 2004.
- ROGALINSKI, T., INGRAM, T., BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47 p. 54– 63, 2008.
- ROMERO I.; RUIZ E.; CASTRO E.; MOYA M. Acid hydrolysis of olive tree biomass. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, n. 6, p. 633–640, 2010.
- ROSSELL, C. E. V. Fermentação do hidrolisado. In: III WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, São Paulo, 2006.
- ROSSI, E. et al. Pré-Tratamentos na Produção de Etanol de Segunda Geração. **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 4, p. 3516-3522, 2014.
- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841-845, 2008.
- SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Elmsford, v. 89, n. 3, p. 246-291, 2005.
- SANTOS, A. F.; **Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. p. 92. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.
- SANTOS, F. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, M. S. R. **Estudo do pré-tratamento de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G**. 2014. p. 76. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

SCHEUFELE, F. B., BUTZKE, A. L., MARRA, I. F., HASAN, S. D. M., FIORESE, M. L. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Engevista**, v. 14, p. 310-321, 2012.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. p. 109. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

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

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

STRAPASSON A., FAGÁ, M. T. W. Energy efficiency and heat generation: an integrated analysis of the brazilian energy mix, **International Energy Journal**, v. 8, p. 50-59, 2007.

SUN, R. C. Detoxification and separation of lignocellulosic biomass prior to fermentation for bioethanol production by removal of lignin and hemicelluloses. **Bioresource Technology**, v. 4, p. 452–5, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

TAHERZADEH M. J.; KARIMI K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621–1651, 2008.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4744–53, 2010.

TOSETTO, G. M. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol***. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2008.

TRINCA, N. R. R. **Produção de bioetanol pelo consórcio com *Zymomonas mobilis* e *Candida Tropicalis* em hidrolisado ácido da casca de soja (*Glycine max*)**. 2014. p. 107. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2014.

TRINCA, N. R. R.; BRUNATTI, A. C. S.; GARCIA-CRUZ, C. H. The influence of the presence of phenolic compounds in culture medium containing acid hydrolysate of soybean hulls as substrate to produce ethanol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, p. 11, 2017.

TOMÁS-PEJÓ E. Fermenting microorganisms for 2nd generation bioethanol production. In: Min-Tze L, editor. *Bioprocess Science and Technology*. New York, USA: Nova publishers; 2011. pp. 107–208

ÚNICA, União das Indústrias de Cana de Açúcar. **Única prevê redução da moagem na safra 2013/2014, com destaque para a queda de produção em SP**. São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/43665534920341709819/unica-preve-reducao-da-moagem-na-safra-2013-por-cento2F2012-por-cento2C-com-destaque-para-a-queda-de-producao-em-sp>> Acesso em: 17 maio 2017.

VIEIRA, R. C.; ANTUNES, D. P. C.; SILVA, M. C. S.; ALMEIDA, R. M. R. G. Estudo do processo de hidrólise de resíduos lignocelulósicos do milho para produção de bioetanol. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, v. 1, n. 2, 2015, Florianópolis. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 2015.

VIGNOLI, J. A. **Efeito da osmolalidade do meio, permeabilização e imobilização de *Zymomonas mobilis* na produção de sorbitol**. 2003. p. 52. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

WADSKOG, I.; ADLER, L. **Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress**. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. **Yeast stress response**. Berlin: Springer, 2003, p. 201-240.

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

WANG, G. S. PAN, X. J.; ZHU, J. Y.; Gleisner R. Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL) for robust enzymatic saccharification of hardwoods. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 4, p. 1086–93, 2009.

WANG, X. et al. Metabolomic analysis reveals key metabolites related to the rapid adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple inhibitors of furfural, acetic acid, and phenol. **OMICS**, v. 17, n. 3, p. 150-159, 2013.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18, p. 1959–1966, 2005.

XING R.; QI W.; HUBER G. W. Production of furfural and carboxylic acids from waste aqueous hemicelluloses solutions from the pulp and paper and cellulosic ethanol industries. **Energy and Environmental Science**, v. 4, n. 6, p. 2193–2205, 2011.

YADAV, K. S.; NASEERUDDIN, S.; PRASHANTHI, G. S.; SATEESH, L.; RAO, L. V. Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6473-678, 2011.

ZHANG, M. et al. Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: Current status and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 215, n. 1, p. 50-62, 2016.

ZHANG, M.; WANG, F.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4959–4964, 2010.

ZHAO, J.; XIA, L. Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain. **Fuel Processing Technology**, v. 90, p. 1193–1197, 2009.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic production, **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2, n. 3, p. 51–68, 2009.

ZHU, J. Y. Physical pretreatment-woody biomass size reduction-for forest biorefinery. ACS symposium series. 2011. Sustainable production of fuels, chemicals and fibers from forest biomass. (Chapter 4). 2011. p. 89–107.

ZHU, J. Y.; PAN, X. J.; WANG, G. S.; GLEISNER, R., 2009. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2411–2418, 2009.

ZHU, J. Y.; PAN, X. J.; WANG, G. S.; GLEISNER, R. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2411–2418, 2009.

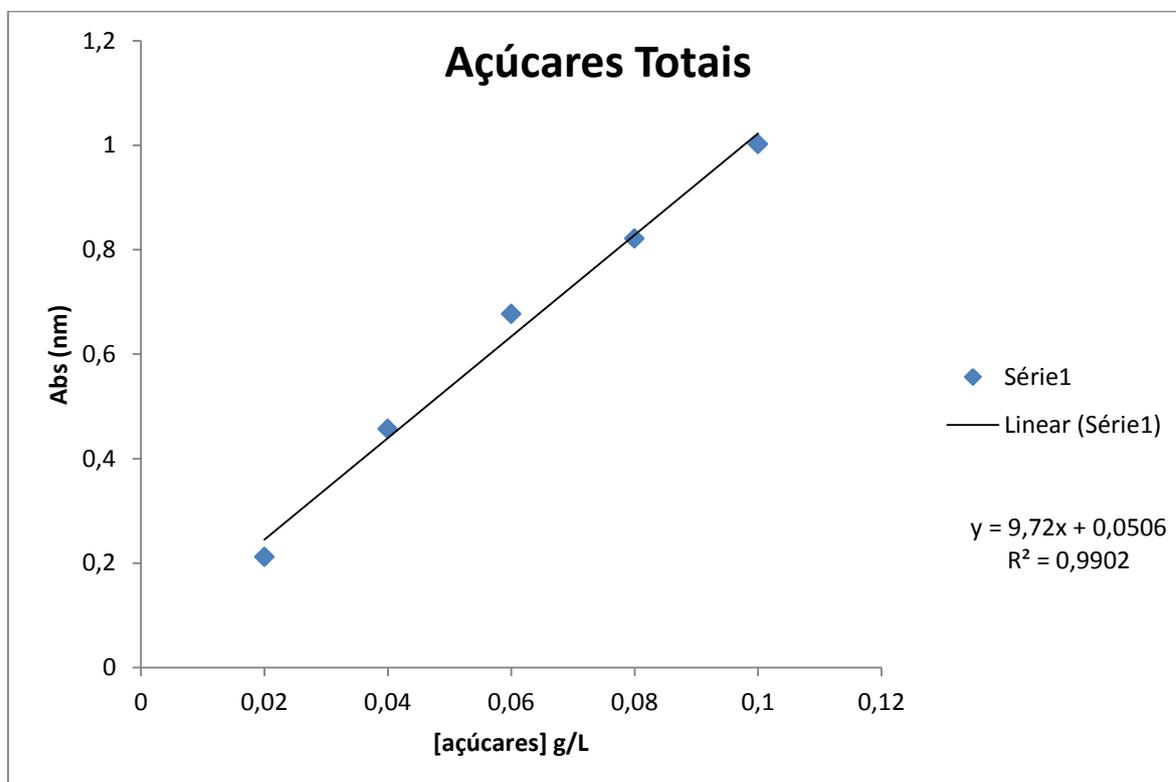
8. ANEXOS

8.1 CURVA PADRÃO DE GLICOSE PARA AÇÚCARES TOTAIS

Tabela 15 – Concentrações de glicose (g/L) e absorvâncias obtidas na construção da curva padrão para quantificação de açúcares totais.

[glicose] (g/L)	Absorbância (nm)
0,02	0,212
0,04	0,457
0,06	0,677
0,08	0,821
0,10	1,002

Figura 34 – Curva padrão de glicose para açúcares totais.

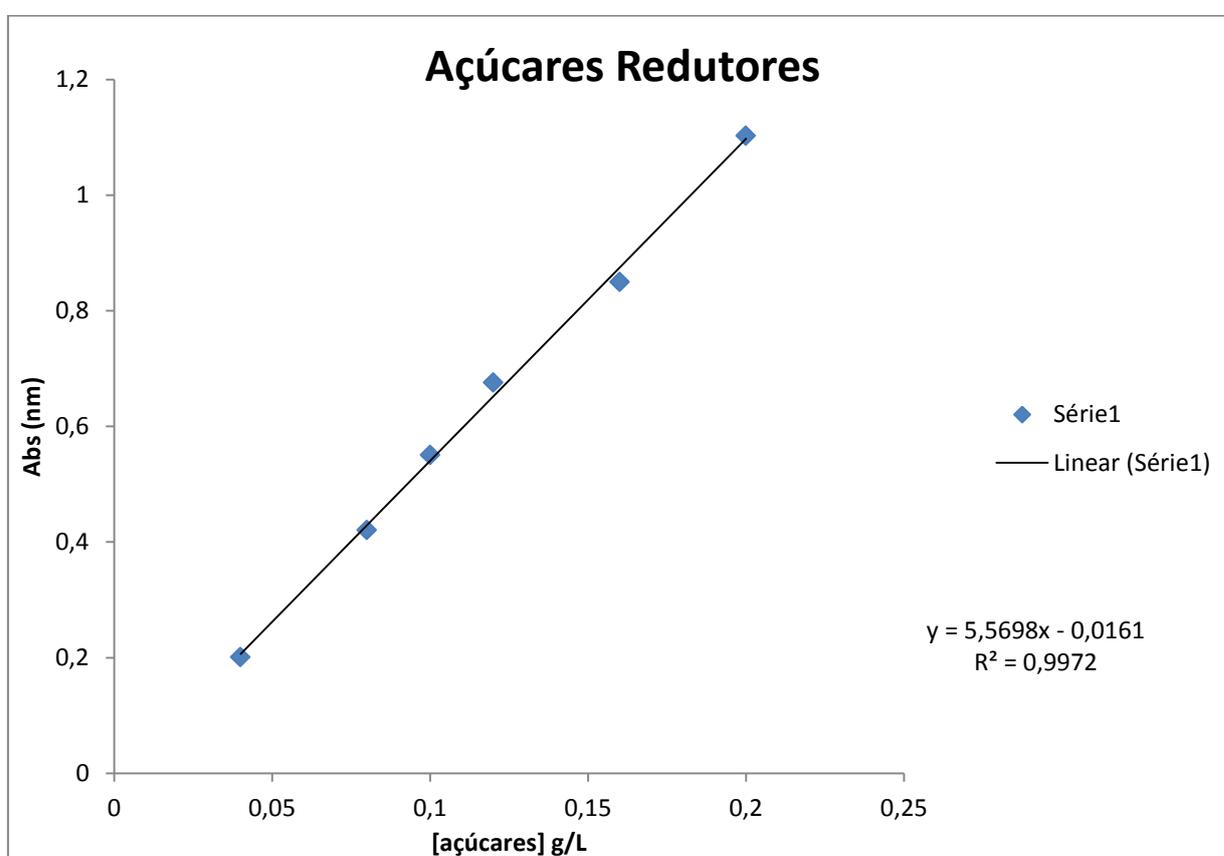


8.2 CURVA PADRÃO DE GLICOSE PARA AÇÚCARES REDUTORES

Tabela 16 – Concentrações de glicose (g/L) e absorvâncias determinadas na obtenção da curva padrão de glicose para açúcares redutores.

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

Figura 35 – Curva padrão de glicose para açúcares redutores.

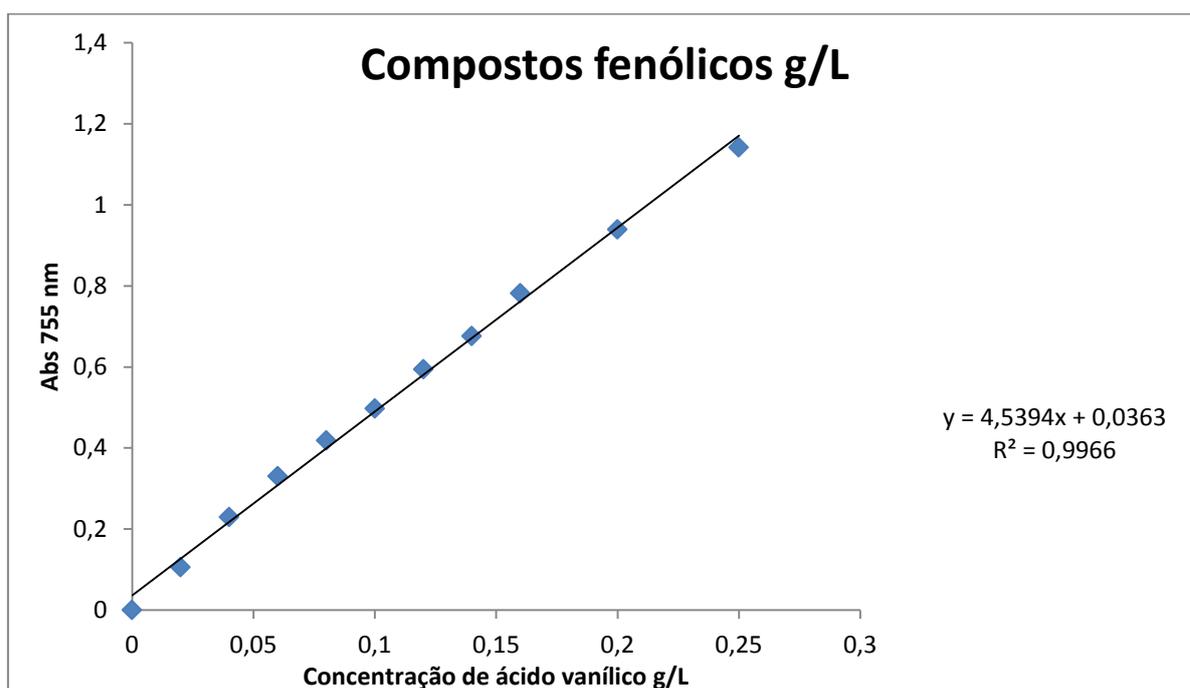


8.3 CURVA PADRÃO DE ÁCIDO VANÍLICO PARA COMPOSTOS FENÓLICOS

Tabela 17 – Concentrações de ácido vanílico (g/L) e absorvâncias determinadas na obtenção da curva padrão de ácido vanílico para determinação de compostos fenólicos.

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

Figura 36 – Curva padrão de ácido vanílico para calculo do teor de compostos fenólicos.



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

Tabela 18 – Peso celular da levedura (g/L) e absorvâncias determinadas na obtenção da curva do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

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

Figura 37 – Curva padrão de glicose para crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*.

