



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

SUZANA FÁTIMA BAZOTI

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR
DE HIDROLISADO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA PRESENÇA DE
ÁCIDO ACÉTICO**

**FLORIANÓPOLIS
2017**

Suzana Fátima Bazoti

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR
DE HIDROLISADO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA PRESENÇA DE
ÁCIDO ACÉTICO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de mestre em
Engenharia Química

Orientadora: Prof. Dr^a. Débora de Oliveira

Coorientadora: Prof. Dr^a. Helen Treichel

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Bazoti, Suzana Fátima

Produção de Etanol de Segunda Geração a Partir de Hidrolisado de Cana-de-Açúcar na Presença de ácido Acético / Suzana Fátima Bazoti ; orientadora, Débora de Oliveira, coorientadora, Helen Treichel. Florianópolis, 2017.

102p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química,

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Bioetanol. 3. Hidrolisado de cana-de-açúcar. 4. Ácido acético. I. Oliveira, Débora. II. Treichel, Helen. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Suzana Fátima Bazoti

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR
DE HIDROLISADO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA PRESENÇA DE
ÁCIDO ACÉTICO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 12 de junho de 2017

Prof. Dr.^a Cíntia Soares
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof Dr. Marco Di Luccio
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr.^a Mara Cristina P. Zenevicz
Instituto Federal de Santa Catarina

Dr. Lindomar Lerin
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

- ♥ Agradeço a todos os membros da banca, por suas contribuições na avaliação deste trabalho.
- ♥ Agradeço as minhas orientadoras: professoras Débora e Helen por toda ajuda, apoio, auxílio, comprometimento, carinho e conhecimento repassados.
- ♥ Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSC.
- ♥ À professora Helen, em especial, por permitir que este trabalho fosse realizado no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos da UFFS - LAMIBI.
- ♥ Ao professor Sérgio Alves, da UFFS Campus Chapecó, por gentilmente ceder as leveduras.
- ♥ Ao CTC por disponibilizar o hidrolisado.
- ♥ À Deus, pela vida e por mais esta conquista.
- ♥ À minha família por me apoiar, amar e entender as minhas ausências neste período. Obrigada aos meus pais por todo apoio!
- ♥ Ao meu melhor amigo, meu confidente, companheiro, meu amor Reginaldo, pela paciência, incentivo, ajuda e por estar ao meu lado em todas as horas e me fazer acreditar que eu conseguiria realizar mais esse objetivo.
- ♥ Aos meus amigos da UFFS: Ângela e Flávia pela linda amizade que construímos por sempre terem me apoiado e compartilhado suas experiências, além de toda paciência e carinho comigo! Ao Diego pelo apoio na realização das análises na Central Analítica.
- ♥ À minha irmã do coração, Sibeles, por todo amor e pelos momentos vividos durante as viagens a Florianópolis, foram grandes aventuras!
- ♥ A todas as pessoas que de alguma forma ajudaram, entre elas a Mara por toda ajuda e por me receber em sua casa, a doce Tamires, por também me acolher em sua casa, e pela ajuda durante a realização das disciplinas e a Ângela pelo apoio.
- ♥ Aos amigos e bolsistas do LAMIBI: Simone, Thamarys, Charline e Bruno.

A todos o meu muito OBRIGADO!

“Sempre permaneça aventureiro.

*Por nenhum momento se esqueça de que
a vida pertence aos que investigam.*

Ela não pertence ao estático;

Ela pertence ao que flui.

*Nunca se torne um reservatório,
sempre permaneça um rio.”*

(Osho)

RESUMO

O etanol de segunda geração se apresenta como fonte de energia limpa e impulsiona os estudos acerca de custos de produção e eficiência de processos industriais, bem como a obtenção de microrganismos capazes de fermentar a biomassa com substratos acessíveis em condições ótimas de processo. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo produzir etanol de segunda geração a partir do hidrolisado da cana-de-açúcar oriundo da indústria canavieira sem remoção do ácido acético. Foram testados quatro micro-organismos isolados de materiais lignocelulósicos. Destes, um foi capaz de produzir etanol na presença de ácido acético, o *UFFS- CE- 3.1.2*. Esta levedura não apresentou 100% de identidade em nenhum dos sequenciamentos, podendo ser considerada uma nova cepa. A partir disto, testou-se a composição do meio, verificando a influência da suplementação. A adição de nutrientes ao meio e o ajuste de pH não aumentaram a produção de bioetanol. A melhor condição encontrada foi a diluição do hidrolisado na proporção 1:3 v/v, sem adição de nutrientes. Realizou-se duas cinéticas de fermentação, uma com pH ajustado para 7 e outra com o pH inicial em 4,88. A fermentação conduzida sem ajuste de pH e adição de nutrientes produziu 9 g/L de bioetanol. Esta levedura se mostrou promissora na produção de etanol de segunda geração, utilizando como fonte de nutrientes o hidrolisado bruto e na presença de inibidores.

Palavras-chave: Bioetanol. Hidrolisado de cana-de-açúcar. Ácido acético.

ABSTRACT

Second-generation ethanol presents itself as a source of clean energy and boosts studies on the production costs and efficiency of industrial processes, as well as obtaining microorganisms capable of fermenting biomass with substrates accessible under optimum process conditions. This work aims to produce second generation ethanol from sugarcane hydrolysate from the sugar cane industry without the removal of acetic acid. Four microorganisms isolated from lignocellulosic materials were tested. Of these, one was able to produce ethanol in the presence of acetic acid, *UFFS-CE-3.1.2*. This yeast did not show 100% identity in any of the sequencing, and could be considered a new strain. From this, the composition of the medium was tested, verifying the influence of the supplementation. The addition of nutrients to the medium and the pH adjustment did not increase bioethanol production. The best condition found was the dilution of the hydrolysate in the proportion 1: 3 v / v, without addition of nutrients. Two fermentation kinetics were carried out, one with pH adjusted to 7 and the other with the initial pH at 4.88. Fermentation conducted without pH adjustment and addition of nutrients produced 9 g/L of bioethanol. This yeast was promising in the production of second generation ethanol, using the crude hydrolysate as nutrient source and in the presence of inhibitors.

Keywords: Bioethanol. Hydrolysate of sugar cane. Acetic Acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organograma do documento da dissertação	25
Figura 2: Estrutura da molécula de celulose.	36
Figura 3: Monossacarídeos que compõe a hemicelulose.	37
Figura 4: Álcoois predominantes na estrutura da lignina: 1- p-cumaril, 2-coniferil, 3- sinapil.	38
Figura 5: Esquema geral de um processo fermentativo.....	41
Figura 6: Fluxograma das etapas realizadas.....	49
Figura 7: Estimativa dos efeitos, ao nível de 95% de confiança, através do gráfico de Pareto, da variável resposta concentração de etanol em 72 horas de fermentação.....	70
Figura 8: Gráfico do consumo de glicose e produção de etanol para ensaio A – sem ajuste de pH	78
Figura 9: Gráfico da variação de xilose, celobiose, arabinose, ácido acético e pH para ensaio A – sem ajuste de pH.....	79
Figura 10: Gráfico do consumo de glicose e produção de etanol para ensaio B – com ajuste de pH	80
Figura 11: Gráfico da variação de xilose, celobiose, arabinose, ácido acético e pH para o ensaio B – com ajuste de pH	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de leveduras e aplicações.....	42
Tabela 2: Composição do meio YPD	51
Tabela 3: Concentração dos compostos utilizados para suplementação do meio.....	52
Tabela 4: Codificação dos níveis para as variáveis de concentração do hidrolisado e para os compostos utilizados para suplementação do meio.	53
Tabela 5: Composição do hidrolisado	57
Tabela 6: Composição dos hidrolisados obtidos na literatura	59
Tabela 7: Resultados da fermentação com os micro-organismos selecionados.	62
Tabela 8: Resultados do planejamento P&B com a levedura UFFS-CE-3.1.2.....	67
Tabela 9: Resultados da fermentação com o aumento do tempo de fermentação e do fator de diluição do meio	72
Tabela 10: Resultados para fermentação com a levedura UFFS-CE-3.1.2 com ajuste de pH do meio.	74
Tabela 11: Valores de pH no início e após 96 horas de fermentação... ..	75
Tabela 12: Valores da biomassa, furfural e HMF em intervalos de 24 horas durante cinética.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2G** – Etanol Segunda Geração
ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ART – Açúcares Redutores Totais
ATP – Adenosina Trisfosfato
CTC – Centro de Tecnologia Canavieira
GEE – Gases do Efeito Estufa
HMF – Hidroximetilfurfural
HPLC - High performance liquid chromatography
IAA – Instituto do Açúcar e Alcool
PB – Planejamento tipo Plackett & Burman
PDA – 10 A - Photo Diode Array Detector
RID – 10 A - Refractive Index Detector
UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar
Y_{P/S} – Fator de conversão de substrato em produto
YPD – Yeast extract – Peptone – Dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 OBJETIVOS.....	29
1.1.1 Objetivo Geral.....	29
1.1.2 Objetivos Específicos.....	29
2. REVISÃO DA LITERATURA	31
2.1 O ETANOL.....	31
2.1.1 Expansão do etanol no Brasil.....	33
2.1.2 Etanol de segunda geração.....	35
2.1.3 Composição da biomassa de cana-de-açúcar.....	35
2.1.4 Hidrólise da biomassa de cana-de-açúcar: geração de compostos inibidores da fermentação alcoólica.....	38
2.2 PROCESSOS FERMENTATIVOS: MICRO-ORGANISMOS E SUBSTRATOS.....	40
2.2.1 Fermentação para a produção de etanol.....	43
2.2.2 Substratos utilizados na fermentação.....	44
2.3 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE..	47
3. MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 MATÉRIA PRIMA E MICRO-ORGANISMOS.....	49
3.1.1 Hidrolisado.....	49
3.1.1.1 Caracterização do hidrolisado.....	50
3.1.2 Micro-organismos - Leveduras.....	50
3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	50
3.3 MANUTENÇÃO E ATIVAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	51
3.4 ENSAIOS PRELIMINARES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	51
3.4.1 Suplementação do hidrolisado.....	52
3.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO.....	52
3.5.1 Testes com aumento do fator de diluição.....	53
3.6 ENSAIOS COM AJUSTE DE PH.....	53

3.7 CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO.....	53
3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	54
3.8.1 Determinação de açúcares, ácido acético e etanol.....	54
3.8.2 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural (HMF)...	54
3.8.3 Determinação da biomassa da levedura.....	55
3.8.4 Determinação do pH do hidrolisado.....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 COMPOSIÇÃO DO HIDROLISADO DE CANA-DE- AÇÚCAR.....	57
4.2 ENSAIOS PRELIMINARES PARA SELEÇÃO DE LEVEDURAS.....	60
4.2.1 Identificação da levedura.....	64
4.3 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO E DILUIÇÃO COM O PLANEJAMENTO DE PLACKETT- BURMAN (P&B).....	65
4.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO AUMENTO DO FATOR DE DILUIÇÃO E DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO..	71
4.5 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO.....	76
4.5.1. Produção de etanol e consumo de substrato.....	77
5. CONCLUSÕES	83
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	85
7. REFERÊNCIAS	87
8 ANEXO A	95
8.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANALISADOS EM HPLC.....	95

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE HIDROLISADO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA PRESENÇA DE ÁCIDO ACÉTICO

Por quê?

1. Escassez de fontes de energia não renováveis e busca por alternativas de energia limpa e sustentável.
2. O Brasil é destaque na produção e pesquisa de bioetanol.
3. Aprimoramento na cadeia de produção de etanol de segunda geração visando diminuir custos e etapas no processo com a remoção de contaminantes.
4. Isolamento de novos micro-organismos com capacidade de fermentar o hidrolisado bruto para obtenção de bioetanol.

Quem já fez?

1. Encontram-se na literatura vários trabalhos que estudam a partir da etapa de hidrólise da biomassa, obtendo hidrolisados com pouco ou nenhum inibidor.
2. Há estudos que desenvolveram processos ou materiais para destoxificação do hidrolisado.
3. Não constam na literatura trabalhos que utilizam somente o hidrolisado bruto oriundo da indústria para obter bioetanol, bem como não utilizam somente esse hidrolisado como fonte de nutrientes para testar novos micro-organismos.

Hipóteses

1. É possível encontrar novos micro-organismos, isolados de materiais lignocelulósicos, que possuam capacidade de produzir bioetanol na presença de inibidores como ácido acético?
2. A utilização de hidrolisado de cana-de-açúcar bruto, oriundo da indústria canaveira, como fonte de nutrientes para fermentação alcoólica é viável?

Metodologia experimental

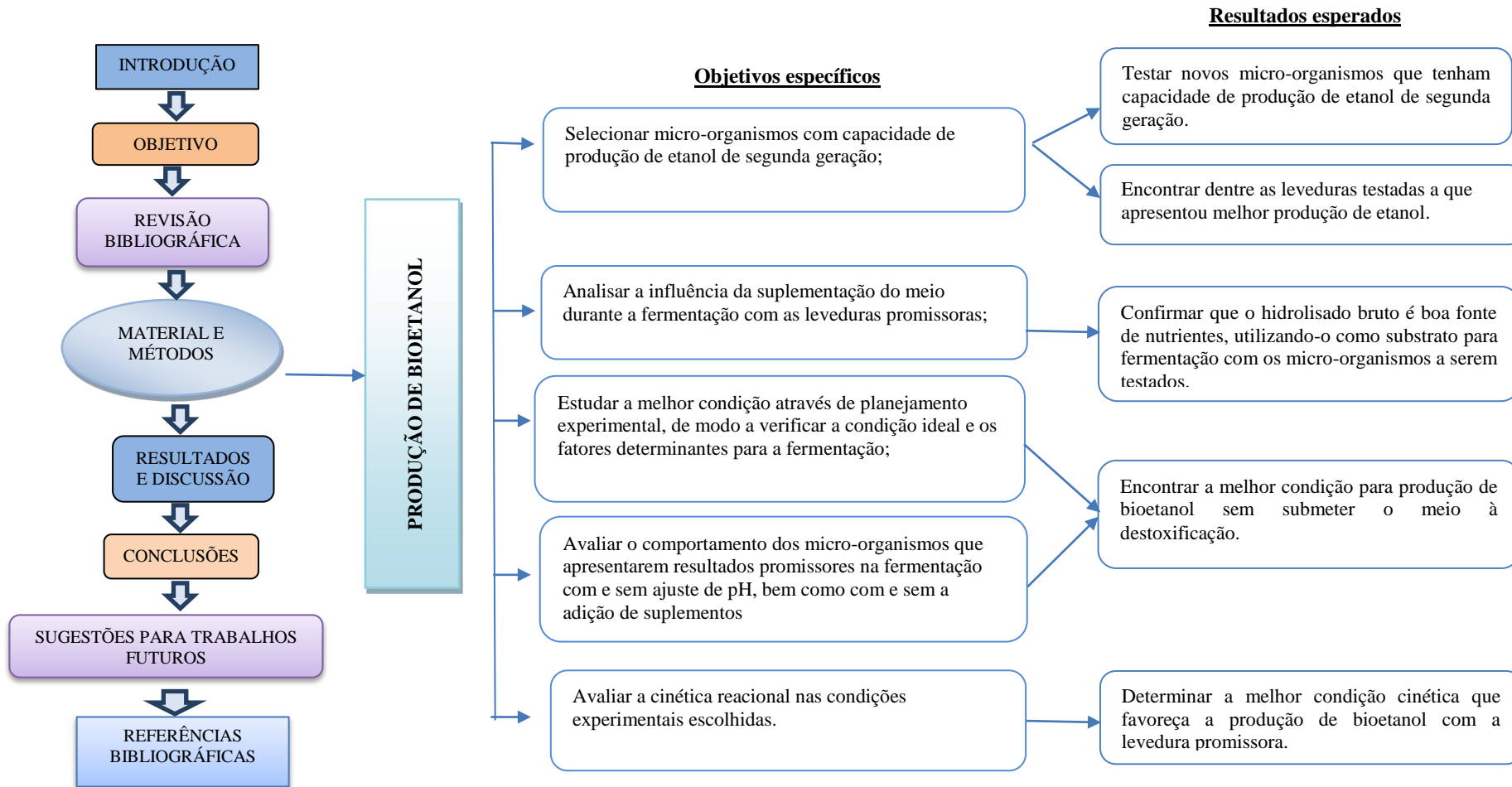
1. Caracterização e quantificação dos compostos presentes no hidrolisado e durante a fermentação, por HPLC.
2. Identificação da levedura promissora.
3. Ensaio preliminares para fermentação alcoólica com a cepa que apresentou os melhores resultados.
4. Otimização dos parâmetros fermentativos e escolha das melhores condições.
5. Ensaio com ajuste de pH.
6. Cinética de fermentação com e sem ajuste de pH.

Resposta

1. Escolher a levedura promissora com capacidade de fermentar o hidrolisado bruto e produzir etanol.
2. Determinar a melhor condição para produção de bioetanol sem submeter o meio à destoxificação.
3. Avaliar o processo de fermentação e o comportamento da levedura pela cinética de fermentação com e sem ajuste de pH.

Este documento será apresentado conforme esquema apresentado na Figura 1.

Figura 1: Organograma do documento da dissertação



1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a demanda por energia vem aumentando e cada vez mais a busca por fontes de energias renováveis ganha importância tanto na pesquisa acadêmica como na indústria. O potencial da cana-de-açúcar, e os novos usos de seus produtos não param de crescer, dando maior destaque para o etanol e a bioeletricidade que são, atualmente, os principais responsáveis pelo crescimento de fontes alternativas no Brasil (UNICA, 2016).

De toda a matriz energética brasileira, mais de 44% advém de fontes renováveis. Com destaque mundial no uso de energias limpas e de toda oferta da energia brasileira o setor sucroenergético é o grande destaque, pois somente a cana-de-açúcar é responsável por 15,7% desta oferta (UNICA, 2016).

O etanol é, portanto, um dos principais responsáveis pelo aumento destas fontes de energia renováveis. Em escala mundial, o etanol obtido da cana-de-açúcar possui boas características em relação à sustentabilidade econômica, social e ambiental, pois este biocombustível reduz em mais de 50% as emissões dos gases de efeito estufa (GEE) em comparação com o uso da gasolina (MACHADO, 2013).

Atualmente o percentual de etanol que é adicionado à gasolina chega a 25% (ANP, 2016). Por se apresentar como a principal fonte de energia limpa, e ser utilizado como combustível, sua importância na matriz energética brasileira aumenta continuamente, impulsionando pesquisas nas mais diversas áreas como custos de produção e eficiência de processos industriais, além da obtenção de micro-organismos capazes de fermentar a biomassa com substratos acessíveis e melhores condições de processo (SIQUEIRA *et al.*, 2008).

A reutilização do bagaço da cana-de-açúcar é extremamente relevante, pois aumenta a produtividade de etanol no mesmo espaço de terra cultivado. Todavia, para se aproveitar deste resíduo, se faz necessária a etapa de hidrólise, que consiste na quebra da biomassa lignocelulósica. Desta etapa, originam-se compostos considerados inibidores em um processo fermentativo como o ácido acético, o furfural e o hidroximetilfurfural, compostos mais conhecidos e relevantes.

A fermentação utilizando leveduras conhecidas na presença dos inibidores é prejudicada, desta forma, novos micro-organismos com potencial de fermentar a biomassa na presença de contaminantes se destacam. Estudos que objetivam isolar micro-organismos de materiais lignocelulósicos ganham espaço e são importantes em relação às características dos micro-organismos isolados.

Quando se possui a pretensão de testar novos micro-organismos em processos fermentativos, algumas características são importantes como a alta conversão de substrato em produto, não diminuir essa conversão quando em contato com alta concentração do produto, não ser patogênico ou produzir substâncias que sejam incompatíveis com o produto além de necessitar condições e substratos baratos (BORZANI *et al.*, 2001).

Além dos micro-organismos utilizados nos processos de obtenção de produtos com alto valor agregado, estudos de novos substratos também são essenciais. Meios ricos em nutrientes e de baixo custo são desejáveis. O hidrolisado obtido da quebra da biomassa da cana-de-açúcar possui características importantes, como baixo custo e a alta concentração de açúcares fermentescíveis, porém apresenta quantidades significativas de inibidores, principalmente o ácido acético.

Desta forma, este trabalho propõe selecionar novos micro-organismos, que foram isolados a partir de materiais lignocelulósicos, para produzir etanol de segunda geração, testando-os em condições adversas, na presença de inibidores como o ácido acético, utilizando somente o hidrolisado bruto, oriundo da indústria da cana-de-açúcar como fonte de nutrientes, viabilizando o processo industrial, reduzindo etapas com a descontaminação do hidrolisado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Produzir etanol de segunda geração a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, na presença de ácido acético sem submeter o meio à destoxificação, visando obter um processo fermentativo não oneroso.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Selecionar micro-organismos com capacidade de produção de etanol de segunda geração;
- Analisar a influência da suplementação do meio durante a fermentação com as leveduras promissoras;
- Estudar a melhor condição por meio de planejamento experimental, de modo a verificar a condição ideal e os fatores determinantes para a fermentação;
- Avaliar o comportamento dos micro-organismos que apresentam resultados promissores na fermentação, com e sem ajuste de pH, bem como com e sem a adição de suplementos;
- Acompanhar o consumo de substrato e a produção de etanol durante a fermentação por meio da análise da cinética de fermentação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo será apresentado o tema abordado nesse trabalho. Falar-se-á sobre a origem, características e expansão do etanol no Brasil, seu crescimento e o surgimento do etanol de segunda geração. A expansão do etanol 2 G a partir da biomassa lignocelulósica, a hidrólise e a obtenção do etanol a partir da fermentação alcoólica, sua importância e aplicações. Também será destacada a relevância da origem da biomassa e a influência de sua hidrólise na geração de compostos inibidores da fermentação. Por fim, falar-se-á sobre micro-organismos fermentadores e substratos, suas características e possíveis aplicações.

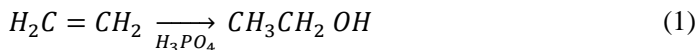
Serão apresentadas questões relevantes no que tange à matriz energética brasileira, bem como a importância desta pesquisa dentro do contexto de energias renováveis. Também é possível destacar a relevância deste estudo pela utilização de um hidrolisado bruto oriundo da indústria canavieira.

2.1 O ETANOL

Conhecido desde a pré-história como o principal componente de bebidas alcoólicas como a cerveja, o vinho e a cachaça, o etanol possui várias aplicações, desde a indústria de alimentos, a farmacologia, indústria de tintas, produtos de limpeza, entre outros usos. Apesar de apresentar demanda em diversas áreas, o etanol possui maior destaque e relevância como combustível, se apresentando como uma fonte renovável e sustentável de energia (MACHADO, 2013).

Dentre as principais características físicas e químicas do álcool etílico ou etanol pode-se salientar que é um líquido incolor, volátil, inflamável, que pertence à classe dos álcoois, e possui uma hidroxila (OH) ligada a CH_2 . De fórmula $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, funde a $-115\text{ }^\circ\text{C}$ e possui uma temperatura de ebulição de $78,3\text{ }^\circ\text{C}$, densidade de $0,789\text{ g/cm}^3$ e é altamente solúvel em água devido à sua polaridade (BARBOSA, 2011).

O etanol pode ser obtido por síntese química ou bioquímica (fermentação). Pela via química ele é obtido pela reação da hidratação do etileno catalisada por ácido, como é mostrado na Equação 1. No entanto este álcool não pode ser utilizado em bebidas alcoólicas (MCMURRY, 2011). Neste caso o etanol obtido não vem de matéria prima renovável, e em escala mundial representa menos de 5 % produção (MACHADO, 2013).



Pela rota bioquímica, sua obtenção ocorre através da fermentação de um substrato rico em açúcares fermentescíveis. Neste processo, os açúcares são transformados em álcool e gás carbônico pela ação de micro-organismos. Após a fermentação, o etanol é separado do caldo por destilação e é purificado. A via fermentativa, também chamada de via biotecnológica, é a mais utilizada no Brasil e na maior parte dos países produtores de etanol (MACHADO, 2006).

Dentre os diversos usos do etanol, o anidro é a forma mais pura do álcool, muito utilizado na indústria como matéria prima para solventes, tintas, aerossóis, entre outros. Este composto requer uma etapa adicional após a destilação, que é a desidratação, gerando um produto final com somente 0,4% de água v/v. Assim, não ocorre a separação de fases em tanques de armazenagem ou em tanques de veículos automotores quando este é adicionado à gasolina e ao diesel, em proporções previstas conforme a legislação brasileira (CORTEZ, 2010).

Além do anidro há outra composição que é amplamente utilizada: o etanol hidratado. Este possui 5% de água, v/v em sua composição e é muito usado em bebidas, alimentos, cosméticos, aromatizantes, produtos de limpeza, remédios e também como combustível para veículos. O etanol hidratado é vendido em postos de combustíveis e o Brasil é o único país que utiliza 100% de álcool hidratado em automóveis (NOVACANA, 2016; MAYER, 2016).

Para os próximos anos, um dos principais desafios é encontrar alternativas de energia limpa e sustentável, tornando-se cada vez menos dependentes do petróleo. Estudos deduziram que o consumo de energia no século XX aumentou 13 vezes mais rápido que a população mundial. Somando-se a isto o gás natural e o carvão, fontes de energia não renovável, contribuem com 82% das necessidades energéticas mundiais. Um quinto das emissões de CO₂ deve-se a 60% dos combustíveis fósseis oriundos do petróleo. Desta forma, para reduzir este impacto se faz necessária a utilização de energia alternativa e sustentável, e o etanol se apresenta como principal substituto da gasolina em meios de transportes automotores (GUPTA, 2014).

A necessidade de se ter uma matriz energética limpa fez com que países como a China, França e Alemanha diversificassem suas matrizes energéticas incluindo quantidades maiores de combustíveis renováveis. Desta forma, o etanol vem ganhando cada vez mais espaço porque sua

cadeia de produção está mais estruturada, desde a obtenção e produção de matérias-primas, o processo industrial de fabricação, até a chegada do álcool etílico ao mercado consumidor (MACHADO, 2013).

A produção de energia, em vários países, tem um foco voltado para as fontes renováveis, devido ao esgotamento das reservas de petróleo bruto. Assim, o etanol se apresenta como um substituto importante da gasolina no mercado de combustíveis, possuindo papel importante com o meio ambiente por não contribuir com o aquecimento global e as mudanças climáticas (GUPTA, 2014).

2.1.1 Expansão do etanol no Brasil

O etanol surgiu no Brasil para amenizar a crise açucareira e diminuir a dependência do petróleo. O etanol foi introduzido na matriz energética brasileira no início do século XX (LEITE, 2007). No governo de Getúlio Vargas foi criado o IAA – Instituto do Açúcar e do Alcool e com a Lei nº 737 a adição de etanol à gasolina tornou-se obrigatória. Por volta da década de 70, após confirmar-se que o petróleo era um recurso natural não renovável, a crise do petróleo estava no auge e por isso o preço do etanol passou por grandes variações, e com isso, passou a ter destaque no cenário nacional (MACHADO, 2013).

Em 1975 iniciou o Proálcool, um programa financiado pelo governo federal que tinha por objetivos diminuir a dependência externa de combustíveis, especialmente do petróleo, contribuir para o avanço da tecnologia nacional, alavancar o desenvolvimento econômico e social, fortalecer o crescimento de bens de capital e gerar emprego e renda no país. O programa obteve sucesso, sendo que de 1975 a 1985 a produção de etanol no Brasil aumentou em 2000%, culminando no aumento de destilarias de etanol juntamente com usinas de açúcar, lançamento de veículos com motores movidos a etanol ou gasolina e em 2003 impulsionou a fabricação dos automóveis *flex-fuel*, que podem rodar tanto com gasolina como etanol hidratado (MACHADO, 2013).

Porém, a trajetória do etanol brasileiro teve alguns entraves como a crise financeira internacional de 2008 que gerou incertezas quanto ao mercado de combustíveis renováveis, comprometendo a competitividade do etanol frente à gasolina (MACHADO, 2013). Apesar da crise e das oscilações no mercado, o etanol manteve sua importância na matriz energética brasileira, uma vez que passou a ser misturado à gasolina em percentuais de até 25% (ANP, 2016).

O Brasil produz 212.186 m³/dia de etanol hidratado e 114.139 m³/dia de etanol anidro em 382 plantas distribuídas pelo país sendo que

destas 97,1% utilizam a cana-de-açúcar como matéria prima (ANP, 2016). Segundo a ÚNICA (2016), em março de 2016, o país consumiu 1,01 bilhões de litros de etanol anidro combustível e 1,16 bilhões de litros de etanol hidratado e em 2015, o país possuía uma área de 10,8 milhões de hectares plantados com cana-de-açúcar.

De toda a matriz energética brasileira mais de 44% advém de fontes renováveis, destacando mundialmente o Brasil no uso de energias limpas. O etanol é um dos principais responsáveis pelo aumento de fontes de energia renováveis. Atualmente, em escala mundial, o etanol obtido da cana-de-açúcar possui as melhores características no âmbito da sustentabilidade econômica, social e ambiental, pois este biocombustível reduz em mais de 50 % as emissões dos gases de efeito estufa (GEE) em comparação com o uso da gasolina (MACHADO, 2013).

O uso do etanol como biocombustível apresenta muitos benefícios. Além de alavancar a economia, impulsionar o mercado da cana-de-açúcar, as vantagens ambientais são extremamente relevantes. Pode-se destacar a contribuição na redução dos gases do efeito estufa, atingindo uma proporção de 8,9:1 no balanço energético (unidade de energia renovável extraída por unidade de energia fóssil inserida), contribuindo na redução da poluição atmosférica e eliminação de contaminantes como chumbo e enxofre presentes na gasolina (CORTEZ, 2010). Devido a sua obtenção ser proveniente do cultivo da cana-de-açúcar, esta cultura oferece vantagens benéficas ao meio ambiente, pois não necessita de irrigação, seus resíduos podem ser facilmente reaproveitados sendo reinseridos na produção da cana, como a vinhaça e águas residuárias que são utilizadas como biofertilizantes, além de gerar emprego e renda aos trabalhadores e obter investimentos em pesquisa e tecnologia para melhorar e aumentar a produção (NAE, 2005).

O balanço energético resultante da produção de etanol da cana-de-açúcar no Brasil é ambientalmente favorável e supera o balanço energético da produção de etanol de milho dos Estados Unidos (MACEDO, 2004). Além do mais, o etanol oriundo do milho e beterraba compete com a produção de alimentos, contribuindo com a insegurança alimentar a nível mundial. Levando-se em consideração a concorrência com a produção de alimentos, o balanço energético e a crescente demanda por energia renovável, o etanol de segunda geração surge como uma alternativa sustentável (ARAÚJO, 2013).

2.1.2 Etanol de segunda geração

Com o intuito de diminuir os impactos ambientais vem-se pesquisando a reutilização do bagaço da cana, também chamada de biomassa lignocelulósica, e o desenvolvimento de novas matérias primas para produzir etanol e gerar energia limpa a partir de biomassa lignocelulósica (RABELO, 2010). O bioetanol se apresenta como fonte de energia limpa e impulsiona os estudos acerca de custos de produção e eficiência de processos industriais, bem como a obtenção de micro-organismos capazes de fermentar a biomassa com substratos acessíveis e melhores condições de processo (SIQUEIRA *et al.*, 2008).

A produção de etanol 2G a partir de materiais alternativos como resíduos agroindustriais vem aumentando nos últimos anos. Utilizando-se o bagaço, a palha da cana e novas tecnologias para conversão da biomassa, o aumento da produção do etanol pode variar de 50 a 100% por hectare (FUGITA, 2010). Mas não é somente com o bagaço da cana-de-açúcar que é possível produzir etanol de segunda geração. Vários estudos relatam a produção a partir do bagaço de maçã hidrolisado, resíduos sólidos de algas, palha de trigo, casca de avelã, bagaço de maçã de caju, entre outros (PARMAR *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2014, ZHANG *et al.*, 2013; HOSGUN *et al.*, 2017; BARROS *et al.*, 2017). No Brasil as biomassas da cana-de-açúcar, palha e bagaço, se destacam sendo economicamente viáveis para a produção de “combustíveis limpos”. Todavia, para se aproveitar todo seu potencial energético é necessário explorar e pesquisar processos viáveis (RABELO, 2010).

2.1.3 Composição da biomassa de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, cujo nome científico é *Saccharum officinarum*, é uma gramínea de origem asiática e sua introdução no Brasil ocorreu pelos portugueses no início do século XVI. Hoje é cultivada em regiões tropicais e subtropicais e principalmente na região centro-sul do Brasil. O principal resíduo da cana é a palha, que representa de 25 a 30% da energia total da planta, e rende até 10 ton/ha/ano de matéria seca. A cana chega à usina inteira, é lavada e esmagada. No esmagamento o caldo é retirado da fibra, e a esta fibra esmagada (bagaço) é adicionada água para remoção do açúcar restantes na biomassa, e esta é seca e passa a ser utilizada em caldeiras para fornecer eletricidade (ROSILLO-CALLE *et al.*, 2005; UNICA, 2016).

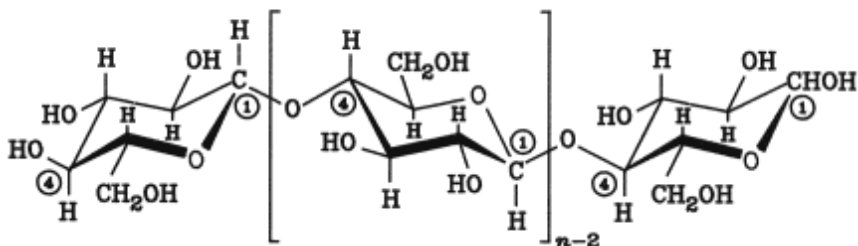
O caldo passa por processos de limpeza, cristalização e purificação, sendo o precursor da fabricação de açúcar e álcool. Já o

bagaço é um material fibroso que além de produzir energia, também é utilizado para produção de *pellets* e brinquedos, em pequena escala, gaseificação, produção de carvão vegetal, ração de animais e controle de ervas daninhas. Porém, o maior uso da cana-de-açúcar no Brasil ainda é para a produção de açúcar e etanol (ROSILLO-CALLE *et al.*, 2005).

Para se conhecer o processo de produção do etanol de segunda geração é importante conhecer as características da biomassa lignocelulósica e seu caminho até a fermentação. Os resíduos lignocelulósicos possuem três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina. Os dois primeiros são compostos por polissacarídeos e a lignina basicamente é formada por material polifenólico. A celulose é o composto presente em maior quantidade, cerca de 40 a 60% (m/m) de massa seco, em seguida a hemicelulose apresenta de 25 a 30% da massa e por último a lignina corresponde de 10 a 25% do material, sendo que estes percentuais variam de acordo com a origem da biomassa. O bagaço da cana-de-açúcar é constituído por 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina, possibilitando que este resíduo seja utilizado para a produção de etanol de segunda geração, e apresente vantagens em relação a outros resíduos como palha de arroz ou palha de trigo devido a alta concentração de açúcares fermentescíveis (PANDEY *et al.*, 2000; FERRAZ, 2010; FONSECA *et al.*, 2011).

A celulose é o polissacarídeo mais encontrado na natureza, considerada a substância orgânica mais abundante renovável do planeta, o polímero natural mais importante, sendo constituída por unidades de glicose unidas pela ligação glicosídica tipo β (1,4). Sua estrutura é mostrada na Figura 2.

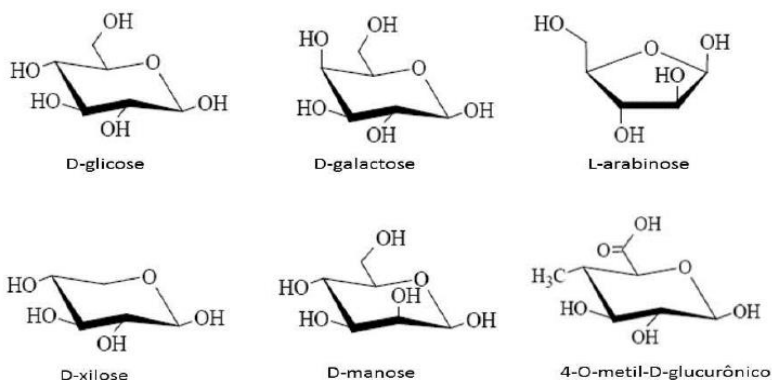
Figura 2: Estrutura da molécula de celulose.



De fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$ e devido à natureza de suas ligações β (1,4), o polímero se dispõe em longas cadeias lineares. Conforme a figura é possível notar que as hidroxilas são distribuídas ao lado dos monômeros permitindo a formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de celulose. Os grupos hidroxila disponíveis para interagir com a água são limitados, o que torna a celulose insolúvel em água apesar de sua polaridade. Uma das principais diferenças da celulose para a hemicelulose é que a primeira não se dissolve em soluções alcalinas, e em relação à lignina a celulose é resistente a agentes oxidantes e susceptível à hidrólise por ácidos (HARMSSEN *et al.*, 2010; VIEIRA, 2009).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por famílias de polissacarídeos como as gluco-mananas, arabino-xilanas, galactanas e outros que são encontrados nas paredes celulares das plantas e sua composição e estrutura variam conforme a origem e o pré-tratamento dado ao material lignocelulósico (HARMSSEN *et al.*, 2010; MEDINA, 2013). Podem se constituir de unidades monoméricas de cinco carbonos, denominadas pentoses, ou de seis carbonos denominadas hexoses, conforme é mostrado na Figura 3. Sua hidrólise ocorre a temperaturas mais amenas que a da celulose, porém em baixas temperaturas é insolúvel em água, sendo solúvel somente em altas temperaturas. Na presença de ácido, a solubilidade melhora consideravelmente (MEDINA, 2013; FONSECA, 2009).

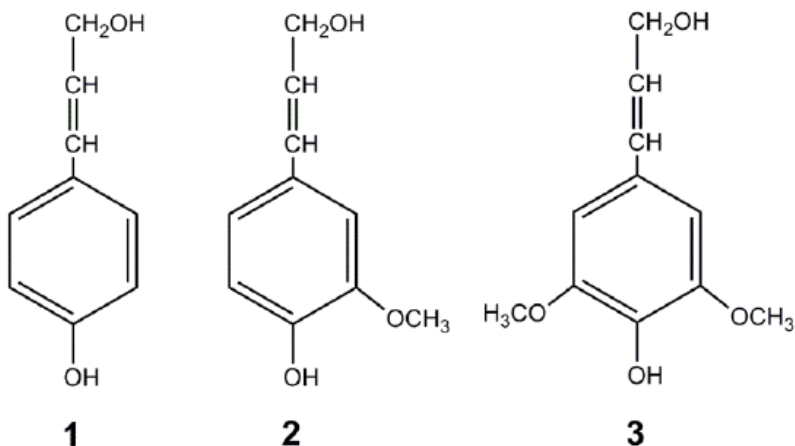
Figura 3: Monossacarídeos que compõe a hemicelulose.



Fonte: Adaptado de PITARELO, 2013

Após a celulose, a lignina é o composto mais abundante na natureza. Além de unir as fibras de celulose, ela aumenta a resistência mecânica das plantas. A Figura 4 mostra as unidades básicas que compõem a lignina, que consistem basicamente em três álcoois principais: o p-cumaril, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico, formando um polímero tridimensional amorfo insolúvel, resistente ao impacto, compressão e flexão (MEDINA, 2013; HARMSEN *et al.*, 2010; FONSECA, 2009).

Figura 4: Álcoois predominantes na estrutura da lignina: 1- p-cumaril, 2- coniferil, 3- sinapil.



Fonte: Adaptado de MEDINA, 2013

2.1.4 Hidrólise da biomassa de cana-de-açúcar: geração de compostos inibidores da fermentação alcoólica

A hidrólise da biomassa é uma etapa importante, pois nela ocorre a quebra das moléculas de celulose, hemicelulose e lignina. Com a ruptura da estrutura vegetal e hidrólise dos polímeros de hidratos de carbono, eles se transformam em açúcares que podem ser utilizados pelos micro-organismos durante a fermentação como substratos. Desta forma, o pré-tratamento é uma operação essencial na conversão bioquímica da composição lignocelulósica, envolvendo a alteração da biomassa, diminuindo a interação entre os componentes da parede

celular tornando-os susceptíveis à sacarificação e fermentação (GÁMEZ *et al.*, 2006; HARMSEN *et al.*, 2010).

Geralmente os processos de beneficiamento do bagaço da cana são compostos por várias etapas como: pré-tratamento, separação sólido-líquido, destoxificação da fração líquida, hidrólise da parte sólida (celulose), fermentação dos açúcares, separação e purificação dos produtos e tratamento de efluentes (FONSECA *et al.*, 2011). No pré-tratamento vários processos são estudados para diferentes materiais celulósicos, dentre os quais pode-se citar a hidrólise ácida, hidrólise enzimática, explosão a vapor, extração com solução alcalina, explosão por amônio entre outros (BALAT *et al.*, 2008; GÁMEZ *et al.*, 2006; RAMOS, 2003; ZHANG *et al.*, 2013; SÁNCHEZ *et al.*, 2008).

Todos os processos apresentam vantagens e desvantagens. Todavia, a obtenção de um hidrolisado com alto teor de açúcares fermentescíveis, o que é considerado um bom substrato para microorganismos fermentadores, depende da origem do material lignocelulósico e tipo de hidrólise, fatores que resultarão em compostos que têm características inibitórias de leveduras, interferindo na produção de etanol.

Na hidrólise ácida, por exemplo, ocorre a geração de compostos tóxicos que prejudicam o desenvolvimento do processo fermentativo (FONSECA, 2009). Ácidos alifáticos, furanos e compostos fenólicos são os principais grupos de inibidores formados após a hidrólise ácida do material lignocelulósico. Essas substâncias resultam da degradação dos carboidratos, da solubilização parcial da lignina causada pela ação do ácido e das altas temperaturas utilizadas na hidrólise ácida (FONSECA, 2009; PALMQVIST *et al.*, 1999).

O furfural e 5-HMF (5- hidroximetilfurfural), compostos derivados do furano, são formados pela degradação das pentoses e hexoses, respectivamente. O furfural pode ainda se degradar a ácido fórmico e o 5-HMF em ácido fórmico e levulínico. Além destes, pode-se destacar o ácido acético, oriundo da hidrólise do radical acetil presente na hemicelulose. Os fatores de inibição por parte destes compostos dependem da origem da biomassa vegetal, das condições da hidrólise e das concentrações dos inibidores no hidrolisado (PALMQVIST *et al.*, 1999).

Dentre os ácidos alifáticos, o ácido acético é o principal ácido presente nos hidrolisados hemicelulósicos e apresenta alta toxicidade para um processo fermentativo. A tolerância ao ácido acético varia de acordo com a espécie e as condições de cultivo empregadas na fermentação. À 25 °C o valor de pKa é 4,75 e em pHs inferiores ao seu

pKa ele se encontra na forma não dissociada. Porém em pHs maiores ele se dissocia, e ao entrar em contato com a célula microbiana diminui o pH intracelular a valores inferiores ao limite fisiológico da célula, desacoplando a produção de ATP da membrana citoplasmática e promovendo o acúmulo intracelular de ânions. O acúmulo de ânions no interior da célula gera excreção de prótons no interior da célula ocasionando a morte celular (FONSECA, 2009; LUO *et al.*, 2002).

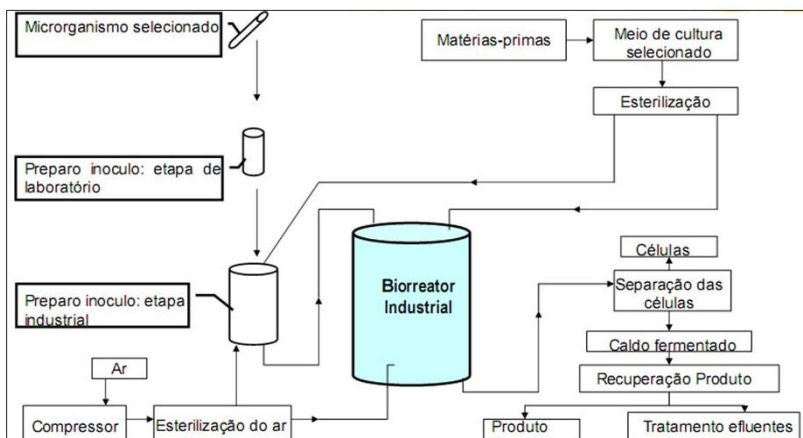
Desta forma, fermentar hidrolisados oriundos de pré-tratamentos convencionais é um grande desafio, pois remover o ácido acético em um processo industrial se torna oneroso e inviável. Utilizar leveduras conhecidas como a *Saccharomyces cerevisiae* acaba por comprometer a fermentação, pois a ação do inibidor interfere e diminui a produção de etanol. Assim, o ácido acético se destaca como um dos “vilões” que dificultam e inibem a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos para obter etanol de segunda geração.

2.2 PROCESSOS FERMENTATIVOS: MICRO-ORGANISMOS E SUBSTRATOS

Os processos fermentativos dependem, basicamente, de quatro aspectos: o micro-organismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo fermentativo e a extração/recuperação do produto. Esses itens relacionam-se entre si e é necessário levá-los em consideração conjuntamente quando se inicia uma fermentação. Vários são os pontos a serem analisados e ponderados, como a questão econômica e biológica, amplamente complexas e decisivas num processo (BORZANI *et al.*, 2001).

A Figura 5 mostra o esquema geral de como ocorre um processo fermentativo. Inicialmente são realizados testes em escala laboratorial, para após aumentar esta escala até se obter a estequiometria para um processo industrial. Geralmente em escala industrial, os bioprocessos ocorrem em reatores, fator que ressalta a importância de se encontrar micro-organismos e meios de cultura/ substratos adequados para utilização em dimensão industrial.

Figura 5: Esquema geral de um processo fermentativo.



Fonte: Adaptado de BORZANI *et al.*, 2001

Em sua maioria, os processos fermentativos utilizam as leveduras como principais micro-organismos atuantes. Na literatura as leveduras são descritas como fungos unicelulares. Nos processos tradicionais a levedura mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, e assim é comum pensar que todas as espécies de leveduras são fermentativas. No entanto, muitas delas têm importante papel na biotecnologia, não sendo, necessariamente utilizadas para fermentação (SATYANARAYANA, 2007).

Pasteur reconheceu o papel e a importância da fermentação para a ciência. Hansen e Muller-Thurgau ao final do século XIX obtiveram as primeiras culturas puras para fermentar cerveja e vinho, e desde então, a fermentação é considerada uma prática padrão na fermentação industrial, principalmente para alimentos e bebidas. Além da indústria alimentícia, há uma vasta gama de produtos obtidos via fermentação como processos industriais consolidados para produção de rações, enzimas industriais, metabólitos de baixo peso molecular, fármacos e bioetanol que utilizam a fermentação como principal via de obtenção de produtos com valor agregado (AMORIM, 2014).

Taxonomicamente, leveduras pertencem a um grupo de organismos formado por fungos que se reproduzem por brotamento. O número de espécies de leveduras existentes pode exceder o que se encontra na literatura, e constituem cerca de 1,0 - 1,5% de todos os fungos conhecidos, e de todas as espécies conhecidas apenas uma

pequena porção é utilizada industrialmente. A Tabela 1 mostra algumas espécies que são altamente utilizadas na biotecnologia.

Tabela 1: Espécies de leveduras e aplicações.

Espécies	Aplicações
<i>Candida milleri</i>	Agricultura
<i>C. shehatae</i>	Bioetanol
<i>C. sake</i>	Proteína
<i>C. oleophila</i>	Biocontrole
<i>C. maltosa</i>	Queijo, salsicha, proteases
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Amilase
<i>D. (Schwannomyces) occidentalis</i>	Riboflavina
<i>Eremothecium ashbyi</i>	Aprimoramento do queijo
<i>Geotrichum candidum</i>	Fermentação de vinho
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Fermentação de leite; proteína do soro
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Fermentação de leite; proteína do soro
<i>K. lactis</i>	Bioetanol
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Astaxantina
<i>Pichia angusta (Hansenula polymorpha)</i>	Bioetanol
<i>P. anomala</i>	Biocontrole
<i>P. pastoris</i>	Proteína heteróloga
<i>P. stipitis</i>	Bioetanol
<i>Pseudozyma flocculosa</i>	Biocontrole
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Caroteno
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Fermentação de cidra
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentação cerveja, pão, vinho; bioetanol, invertase; proteína heteróloga
<i>S. exiguus</i>	Agricultura
<i>S. boulardii (S. cerevisiae)</i>	Probiótico
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Amilase
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Agricultura
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Molho de soja

Fonte: Adaptado de SATYANARAYANA, 2007.

Os mais diversos micro-organismos foram descobertos em habitats não muito comuns, e até hoje são encontrados em ambientes adversos como nos polos onde as temperaturas são extremamente baixas. Alguns micro-organismos sobrevivem a temperaturas superiores aos 100 °C, enquanto é possível encontrar os que vivem em salmouras ou em faixas de pHs limites, próximo de 1 ou acima de 12. Outros

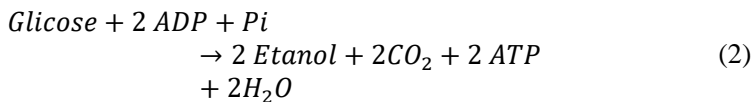
suportam pressões hidrostáticas e até radioatividade, e ainda há aqueles que são resistentes a compostos, como a *Saccharomyces cerevisiae*, que é resistente ao etanol resultante da fermentação (SATYANARAYANA, 2007).

Encontrar e isolar micro-organismos que sobrevivam em ambientes com condições extremas faz com que estes sejam resistentes a condições adversas, como pH extremo, altas ou baixas temperaturas, elevadas concentrações de substrato, compostos inibidores. Além disso, possuem capacidade natural de converter os mais diversos subprodutos em compostos de interesse industrial (POLETO *et al.*, 2015).

O isolamento de micro-organismos a partir de recursos naturais é muito importante para obtenção de linhagens que possam ser aplicadas industrialmente. Apesar de ser um trabalho experimentalmente árduo e em muitos casos de alto custo, podem-se obter linhagens com elevada produção de substâncias com alto valor agregado, ou processos com elevada taxa de produção, o que é economicamente interessante (BORZANI *et al.*, 2001).

2.2.1 Fermentação para a produção de etanol

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico de conversão de açúcares (ART – açúcares redutores totais) em etanol e CO₂, produtos da excreção das leveduras sem utilidade metabólica para a célula (SANTOS *et al.*, 2010). Neste processo a taxa de reprodução é baixa, porém a produção de etanol e CO₂, produtos finais da fermentação conforme mostra a Equação (2), é significativa principalmente quando o meio possuir uma alta concentração de açúcares (MARTINS, 2011).



Tradicionalmente, utiliza-se *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação para obter etanol de segunda geração. Porém, já foram testadas outras leveduras consideradas não convencionais. *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilu* e *Candida tropicalis* foram estudadas e fermentam xilose e celobiose. Todavia, o rendimento de etanol se apresentou inferior quando comparado à produção por *Saccharomyces*, além de necessitarem de oxigênio, o que aumenta o custo e diminui o

interesse industrial (SATYANARAYANA, 2007; FERREIRA, 2010; MEDINA, 2013; MACHADO, 2013).

A levedura *Pichia stipitis* possui boa capacidade de produzir etanol a partir de diferentes hidrolisados lignocelulósicos. Ela já foi testada com hidrolisado de cana-de-açúcar, sabugo de milho pré-tratado com ácido sulfúrico, hidrolisado hemicelulolítico de *giant reed* entre outros. No entanto, a cepa utilizada em fermentações apresenta sensibilidade a compostos inibitórios presentes nos hidrolisados hemicelulósicos, e requer condições micro-aeróbicas para alcançar uma produtividade satisfatória de etanol, tornando-se economicamente inviável o seu uso em grande escala (MACHADO, 2013).

As leveduras adequadas para fermentação alcoólica devem possuir tais características, especialmente, alta velocidade de fermentação, resistência a concentração de produtos, neste caso devem ser resistente ao etanol, não apresentar inibição pelo substrato, produzir pouca ou nenhuma espuma e resistir a uma faixa relativamente baixa de pH (MACHADO, 2013).

Algumas características dos micro-organismos são importantes quando se pretende utilizar processos fermentativos em escala industrial. Alta conversão de substrato em produto, não reduzir essa conversão quando em contato com alta concentração do produto, não ser patogênico ou produzir substâncias que sejam incompatíveis com o produto além de necessitar condições e substratos baratos são características altamente desejáveis para sua utilização em processos de alta escala (BORZANI *et al.*, 2001).

2.2.2 Substratos utilizados na fermentação

Da mesma forma que os micro-organismos utilizados nos processos fermentativos são importantes, os substratos também possuem alta importância. Eles são fonte de nutrientes para que os micro-organismos produzam a substância desejada em condições economicamente viáveis.

Os substratos utilizados devem atender às necessidades do micro-organismo, sendo o menos dispendiosos possíveis, resistentes a possíveis mudanças de pH ou formação de espumas, fator indesejável em processos industriais, não interferir na recuperação do produto, não possuir compostos tóxicos que venham a produzir efluentes difíceis de tratar e possuir composição estável e passível de armazenamento. Dentre todas estas características, o custo é a principal, pois encarecerá todo o

processo, tornando-o inviável para se aplicar em grande escala (BORZANI *et al.*, 2001; POLETO *et al.*, 2015).

Os micro-organismos necessitam de alguns compostos que todo substrato deve conter. Fonte de carbono, que pode ser a glicose, sacarose, frutose ou polissacarídeos como o amido e a celulose. Necessitam ainda de nitrogênio ou aminoácidos, fósforo entre outros elementos como sódio, potássio, cálcio, ferro, magnésio, cobre, etc. Porém, estes últimos em pequenas quantidades para não se comportarem de forma inibitória, (BORZANI *et al.*, 2001).

As indústrias de celulose e papel, por exemplo, geram resíduos com quantidades significativas de açúcares, como xiloses, arabinose, glicose, galactose e manose. Esses compostos são importantes fontes de nutrientes para os processos fermentativos, podendo ser utilizados na obtenção de etanol, e outros produtos de maior valor agregado (BORZANI *et al.*, 2001; PATERAKI *et al.*, 2016).

Em meios sintéticos é fácil controlar a quantidade de nutrientes, porém o processo pode se tornar oneroso e, às vezes, inviável. O interesse na produção de polímeros, fármacos e outros compostos com alto valor agregado, impulsionam estudos para descobrir novos substratos a partir dos mais diversos produtos. Resíduos, lixo orgânico, biomassa lignocelulósica, produtos de origem agrícola como raízes de mandioca, caju, avelã, maçã entre outros se destacam por possuírem uma composição diversificada e rica em nutrientes para obtenção dos mais diversos produtos por via biotecnológica (PARMAR *et al.*, 2012; THUY *et al.*, 2017; HOSGUN *et al.*, 2017; BARROS *et al.*, 2017).

O uso de matérias primas brutas como o hidrolisado da biomassa da cana-de-açúcar se apresenta como uma fonte natural de nutrientes para leveduras produtoras de etanol, além de ser mais barato. Mesmo que sua composição não seja completa em termos de nutrientes, para aplicá-los em processos industriais basta saber a concentração de seus compostos e, se necessário, suplementar com os nutrientes faltantes e que são indispensáveis para a produção de etanol.

O Brasil e os Estados Unidos representam aproximadamente 80% da oferta mundial de etanol, mas a produção no Brasil se dá a partir de cana-de-açúcar, sendo que o bagaço gerado pelo processo não é desperdiçado, pois quando não é utilizado para produzir etanol de segunda geração é aproveitado para gerar vapor de processo e eletricidade (BAEYENS *et al.*, 2014). Assim, a produção brasileira de bioetanol se destaca mundialmente e impulsiona as pesquisas para melhoramento da hidrólise da biomassa, bem como, a descoberta e

isolamento de novos micro-organismos para utilização em processos biotecnológicos de produção de bioetanol.

A concorrência com a produção de alimentos faz com que o etanol de segunda geração seja uma fonte renovável de energia bastante atraente, pois a biomassa lignocelulósica, matéria prima do bioetanol, possui baixo custo e alta disponibilidade (BAEYENS *et al.*, 2014).

O uso de substratos alternativos é uma prática comum para a obtenção de bioetanol de cana-de-açúcar, por exemplo, onde são utilizados licores obtidos da hidrólise da biomassa. Na literatura são encontrados vários trabalhos que hidrolisam e fermentam materiais lignocelulósicos para obtenção de etanol de segunda geração. Processos como sacarificação e fermentação simultâneos (RAMOS *et al.*, 2015; VÁSQUEZ, 2007; KÁDÁR *et al.*, 2003), fermentação e hidrólise separadas (RODRIGUES *et al.*, 2016) comparação dos processos de hidrólise enzimática com hidrólise utilizando peróxido de hidrogênio (RABELO *et al.*, 2011) e hidróxido de cálcio (RABELO *et al.*, 2013), sacarificação enzimática (SILVA, 2009) entre outros são comuns e bastante estudados, variando-se apenas a matriz celulósica.

Além disso, há estudos que utilizam leveduras para remoção de contaminantes presentes em hidrolisados, visando obter meios com pouca ou nenhuma quantidade de compostos inibidores à fermentação, facilitando o uso de leveduras conhecidas (FONSECA, 2009; FONSECA, 2011; CANDIDO, 2015). Também se encontram estudos referentes ao uso de leveduras termotolerantes o que auxilia no processo de quebra da biomassa lignocelulósica (COSTA, 2011). Outra característica é a alta concentração de xilose em hidrolisados, e por isso há estudos que avaliam o desempenho de leveduras que fermentam este açúcar (FUGITA, 2010).

Esses processos apresentam bons resultados, com produções de etanol que variam de 2 g/L até concentrações maiores como 30 g/L, porém, em sua maioria, estes trabalhos iniciam com a hidrólise da biomassa lignocelulósica, e extraem esses hidrolisados em condições controladas e geralmente todo o processo acontece em escala laboratorial. Além disso, quando utilizam esse hidrolisado obtido, adicionam nutrientes à fermentação. Também extraem destes meios os compostos inibidores, como ácido acético e furfural conduzindo a fermentação com as condições ótimas de processo.

Neste trabalho, sugere-se utilizar o hidrolisado obtido industrialmente, e fermentá-lo com novas estirpes, sem passar por processos de destoxificação. É um grande desafio, pois além de se utilizar uma levedura que não é conhecida, também se propõe o uso de

hidrolisado bruto como fonte de nutrientes para esta levedura produzir etanol de segunda geração.

2.3 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

O Brasil se destaca na produção e na pesquisa por busca de fontes alternativas e uso de energias limpas. O etanol é um dos principais responsáveis pelo aumento de fontes de energia renováveis, pois é obtido da cana-de-açúcar e apresenta boas características em relação à sustentabilidade econômica, social e ambiental, sendo capaz de reduzir em mais de 50% as emissões dos gases de efeito estufa em comparação com o uso da gasolina.

Para se obter o bioetanol algumas etapas são importantes como a hidrólise da biomassa. Nesta parte do processo ocorre também a geração de inibidores, que representa um entrave nos processos fermentativos. Um dos inibidores mais relevantes é o ácido acético, pois inibe a ação do micro-organismo fermentador e é de difícil remoção.

Assim a busca por alternativas que melhorem o processo e não aumentem custos de produção é relevante. O isolamento de novos micro-organismos é uma delas, pois ao se trabalhar com uma cepa que foi isolada de materiais com características semelhantes à do substrato utilizado aumenta as chances de se obter boa produção sem adicionar etapas.

Este trabalho testou leveduras que foram isoladas de materiais lignocelulósicos, possuindo a matriz semelhante à do hidrolisado utilizado como substrato. Utilizou-se o hidrolisado da cana-de-açúcar como fonte de nutrientes para estes micro-organismos, testando a adição de nutrientes e o pH.

Diante deste contexto, e do que foi exposto na seção da revisão da literatura, este trabalho vai ao encontro da pesquisa por melhorias na cadeia de produção do bioetanol. O isolamento de novos micro-organismos contribui para o aumento e avanços em processos biotecnológicos, bem como na diminuição de gastos com remoção de contaminantes e ajustes de variáveis do processo como pH, temperatura e adição de nutrientes.

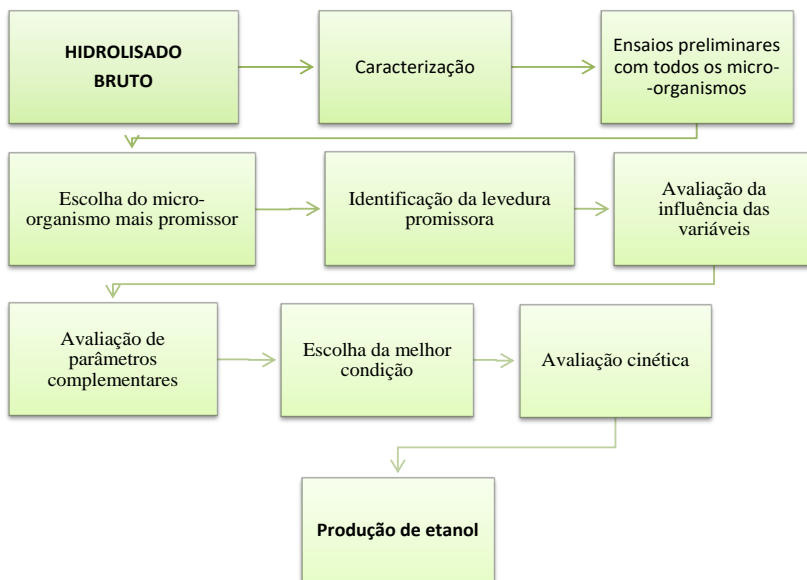
A relevância deste estudo se dá pela utilização de um hidrolisado bruto, oriundo da indústria canavieira, somado à utilização de micro-organismos isolados a partir de fontes lignocelulósicas. Assim, não ocorreu o acréscimo de etapas como a destoxificação do hidrolisado ou modificação genética de leveduras, o que muito contribui para o processo ser desenvolvido e/ou ampliado em escala industrial. Portanto,

esta pesquisa se torna importante porque une conhecimento científico com a utilização de produtos gerados e empregados na matriz energética brasileira.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo descreverá os métodos utilizados para a pesquisa. A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos da Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim RS. A Figura 6 apresenta um fluxograma que descreve as etapas do estudo realizado.

Figura 6: Fluxograma das etapas realizadas.



Fonte: Autor, 2017.

3.1 MATÉRIA PRIMA E MICRO-ORGANISMOS

3.1.1 Hidrolisado

O hidrolisado celulósico utilizado foi gentilmente cedido pelo CTC - Centro de Tecnologia Canavieira de São Paulo. O caldo foi obtido a partir da hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar, sendo a principal matéria constituinte para obtenção de etanol de segunda geração. O caldo hidrolisado foi gerado após a hidrólise enzimática utilizando a enzima Cellic CTec3 (Novozymes) de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor nas seguintes condições: 11 bar de pressão

por 13 minutos de tempo de retenção dentro do reator tipo Stex (reator de 65 L com 8 kg de volume de trabalho).

3.1.1.1 Caracterização do hidrolisado

Foram caracterizadas as principais frações de glicose, xilose, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, celobiose, arabinose, etanol e foi realizado o acompanhamento da variação do pH. Durante os ensaios de fermentação e a cinética foram acompanhadas as variações das concentrações de glicose, xilose, ácido acético, celobiose, arabinose e etanol. A metodologia analítica usada para esta caracterização está descrita no item 3.8.

3.1.2 Micro-organismos - Leveduras

As leveduras utilizadas foram cedidas pela Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus de Chapecó SC. Elas foram isoladas na Floresta Nacional de Chapecó, pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Sérgio Luiz Alves Junior. Os ensaios fermentativos iniciais utilizaram quatro leveduras: *UFFS-CE-3.1.2*, *UFFS C3.6*, *MAF CE 4AE.9* e *FLONA C3.4*.

Dentre os micro-organismos selecionados, a *UFFS-CE-3.1.2* trata-se de uma espécie ainda não descrita pela literatura e não apresenta 100% de identidade em nenhum sequenciamento. Diante disso usar-se-á a nomenclatura usual.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

As cepas foram enviadas ao Instituto Biológico de São Paulo para identificação. O DNA dos isolados foi extraído conforme método descrito por Doyle e Doyle (1987) a partir do micélio crescido em meio de cultura. A amostra de DNA genômico extraído foi submetida à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação da região ITS (internal transcribed spacer) do rDNA. Os oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS foram ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (WHITE *et al*,1990). A mistura para a PCR consistiu de 1 µL de DNA, 1 µL de cada primer a 10 µM, 10 µL de tampão para PCR 5X, 1 µL de dNTPs a 10 mM, 0,2 µL de GoTaq DNA polimerase 5 U/µL (Promega) e 35,8 µL H₂O MilliQ® autoclavada, para um volume final de 50 µL. O programa de

amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94 °C/2 min seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C/10 s, anelamento a 54 °C/30 s, extensão a 72 °C/45 s, e extensão final a 72 °C/4 min. A verificação dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio. Os produtos amplificados foram purificados por precipitação com polietilenoglicol (SCHMITZ, 2006), submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 XL (Applied Biosystems). Sequências similares às obtidas para os isolados do presente estudo foram encontradas no GenBank pela ferramenta Blastn (DOYLE,1987).

3.3 MANUTENÇÃO E ATIVAÇÃO DAS LEVEDURAS

As leveduras foram repicadas a partir de uma cultura estoque mantidas a aproximadamente 4 °C. O armazenamento, repique e inoculação ocorreram em meio YPD. A composição deste meio está descrita na Tabela 2. A reativação das leveduras deu-se em tubos de ensaio contendo o meio previamente esterilizado em autoclave, mantidas a 30 °C por 72 horas em estufa bacteriológica. Em seguida, as leveduras foram inoculadas em 10 mL de meio YPD líquido, permanecendo por mais 24 horas a 30 °C na estufa. Em seguida deu-se início à fermentação, vertendo-se o inóculo, contendo 10 mL de meio líquido com as leveduras e, 90 mL de hidrolisado previamente esterilizado e suplementado de acordo com cada teste realizado.

Tabela 2: Composição do meio YPD

Composto	Concentração (%)
Extrato de levedura	1
Peptona	2
Glicose	2
Ágar-ágar	2

Fonte: Adaptado de Costa, 2011.

3.4 ENSAIOS PRELIMINARES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Para se testar a capacidade de produção de etanol das leveduras escolhidas diluiu-se o hidrolisado numa proporção 1:3 (v/v). Esta diluição foi determinada após a realização de experimentos preliminares

(dados não mostrados). O meio foi previamente diluído e suplementado, dividido em frações de 90 mL disposto em erlenmeyers de 250 mL, tampados com algodão hidrofóbico e esterilizados em autoclave a 120 °C por 15 minutos. As fermentações foram conduzidas em shaker New Brunswick Scientific a uma temperatura de 30 °C, 50 rpm, sendo que após verter 10 mL de inóculo nos erlenmeyers os mesmos foram vedados com Parafilm M® para manter a fermentação com baixo nível de oxigênio. As amostras foram retiradas após 24, 48 e 72 horas de fermentação para análise dos compostos em HPLC.

3.4.1 Suplementação do hidrolisado

Realizou-se a suplementação do hidrolisado. A concentração dos nutrientes adicionados ao meio de fermentação está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Concentração dos compostos utilizados para suplementação do meio.

Componente	Concentração (g/L)
NH ₄ SO ₄	4,50
MgSO ₄	0,40
KH ₂ PO ₄	5,00
Extrato de levedura	3,00

Fonte: Badino, *et al.*, 2003

3.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO

Trabalhou-se com hidrolisado diluído e adição de quatro nutrientes ao meio, desta forma é necessário investigar quais destas variáveis são significativas para produção de etanol nas condições propostas. Com a finalidade de se avaliar os efeitos destas variáveis, optou-se por realizar um planejamento tipo Plackett & Burman (PB). Os delineamentos experimentais deste tipo de planejamento são eficientes em situações que envolvam variáveis quando apenas os efeitos principais são importantes. A matriz deste tipo de planejamento é ortogonal, o que permite que os efeitos principais de cada variável sejam determinados individualmente, o que é adequado para situações exploratórias, como é o caso desta etapa.

Os parâmetros avaliados com este planejamento foram a influência de cada nutriente adicionado na suplementação e o fator de

diluição do hidrolisado. A Tabela 4 descreve as variáveis utilizadas e os níveis escolhidos para cada variável.

Tabela 4: Codificação dos níveis para as variáveis de concentração do hidrolisado e para os compostos utilizados para suplementação do meio.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
X ₁ (Proporção da diluição do hidrolisado v/v)	1:3	1:1	Bruto
X ₂ (NH ₄ SO ₄) g/L	0,00	4,50	9,00
X ₃ (MgSO ₄) g/L	0,00	0,40	0,80
X ₄ (KH ₂ PO ₄) g/L	0,00	5,00	10,00
X ₅ (Extrato de Levedura) g/L	0,00	3,00	6,00

Fonte: Autor, 2017.

3.5.1 Testes com aumento do fator de diluição

Após a avaliação dos resultados do planejamento de Plackett & Burman foi essencial a investigação do aumento do fator de diluição do hidrolisado como meio fermentativo. Assim, aumentou-se a diluição do meio para a proporção 1/5 (v/v) e comparou-se a produção de etanol utilizando o hidrolisado com maior diluição. Também se avaliou a produção de etanol em relação à suplementação e para isso foram conduzidos testes com e sem a adição de nutrientes.

3.6 ENSAIOS COM AJUSTE DE PH

Depois de avaliado o efeito do fator de diluição foram realizados dois ensaios com a diluição 1:3 v/v, sendo um ensaio com suplementação e um não suplementado e em ambos o pH do meio foi ajustado para 7 com uma solução de NaOH 1 mol/L para se avaliar o efeito do pH no meio.

3.7 CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO

Foram conduzidas duas cinéticas de fermentação. Uma reação ocorreu com o pH ajustado para 7, e outra com o pH inicial do hidrolisado, em torno de 5. O meio foi preparado em dois béqueres de 2

L, sendo que em um ocorreu ajuste de pH. Em seguida foi fracionado em oito erlenmeyers de 250 mL, contendo 90 mL de hidrolisado cada.

Durante a cinética as amostras foram retiradas a cada 6 horas para acompanhar as concentrações de glicose, xilose, ácido acético, celobiose, arabinose e etanol. Retiraram-se 10 mL de amostra de cada erlenmeyer por dia, sendo que após quatro amostragens, os 60 mL restantes foram utilizados para determinar o crescimento da biomassa da levedura, HMF e furfural, que foram monitorados em intervalos de 24 horas. A biomassa foi determinada por meio da diferença de massa seca e os compostos furanos em HPLC.

3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

A quantificação dos compostos presentes no hidrolisado celulósico foi realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu equipado com os detectores RID 10-A e PDA 10-A.

3.8.1 Determinação de açúcares, ácido acético e etanol

A determinação de glicose, xilose, celobiose, arabinose, ácido acético e etanol foi conduzida em HPLC, equipado com detector de índice de refração, RID-10 A, operado com coluna AMINEX[®] BIORAD HPX87H, utilizando como fase móvel H₂SO₄ 0,005 M, modo isocrático, temperatura de 45 °C, volume de injeção de 20 µL e vazão de 0,6 mL/min. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em membrana de 45 µm de acetato de celulose. O eluente foi filtrado a vácuo com membrana de 0,45 µm Millipore[®], e em seguida degaseificado em banho de ultrassom por 15 minutos.

A concentração dos compostos foi determinada por meio de curvas de calibração utilizando-se padrões específicos para HPLC da marca *Sigma-Aldrich* (adaptado de SILVA, 2009).

3.8.2 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural (HMF)

A quantificação de furfural e HMF foi realizada em HPLC equipado com detector de arranjo de diodos, PDA, operado com coluna C18 utilizando como fase móvel acetonitrila/água 1:8 com 1 % de ácido acético a temperatura de 30 °C, modo isocrático, volume de injeção de 20 µL e vazão de 0,8 mL/min. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em membrana de 0,45 µm de PTFE. O eluente foi filtrado

com membrana de 0,45 µm Millipore[®], e em seguida degaseificado. A concentração dos compostos foi determinada por meio de curvas de calibração utilizando-se padrões específicos para HPLC da marca *Sigma-Aldrich* (adaptado de SILVA, 2009).

3.8.3 Determinação da biomassa da levedura

A biomassa do micro-organismo foi determinada pela diferença de massa seca, sendo a análise realizada durante a cinética de fermentação. Utilizaram-se 60 mL de meio fermentado após cada 24 horas de reação sendo esta parte filtrada em papel filtro quantitativo, e este levado à estufa em uma temperatura de 40 °C durante 24 horas. O papel foi pesado com a amostra úmida e após 24 horas com a amostra seca, determinando-se a biomassa pela diferença.

3.8.4 Determinação do pH do hidrolisado

O pH do hidrolisado foi determinado por leitura em potenciômetro Tec-5 da marca Tecnal, previamente calibrado com solução padrão antes de cada medição.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos no decorrer deste trabalho. Iniciar-se-á com discussão da composição do hidrolisado. Após isso será comentado o ensaio realizado com as leveduras propostas neste estudo. Dentre as quatro falar-se-á da cepa promissora e sua identificação.

Depois da identificação serão analisados e discutidos a influência da adição de nutrientes, o fator de diluição do meio, o tempo de fermentação e o ajuste de pH. Depois de estabelecidas e comentadas essas variáveis, serão apresentados os resultados de duas cinéticas: uma com ajuste de pH e outra sem ajuste de pH e discutidos os valores obtidos.

4.1 COMPOSIÇÃO DO HIDROLISADO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A composição do hidrolisado utilizado como substrato neste trabalho é apresentada na Tabela 5. Foram determinadas as concentrações de glicose, xilose, celobiose, arabinose e os compostos inibidores ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, conforme os métodos descritos nos itens 3.8.1 e 3.8.2.

Tabela 5: Composição do hidrolisado

Compostos	Quantidade (g/L)
Glicose	45,71
Xilose	28,50
Celobiose	6,32
Arabinose	1,05
Ácido Acético	9,18
Furfural	0,36
Hidroximetilfurfural	0,17
pH	4,85

Fonte: Autor, 2017.

Este hidrolisado hemicelulósico possui alta quantidade de açúcares fermentescíveis, destacando-se a glicose, um carboidrato muito utilizado e de fácil metabolização na fermentação alcoólica por leveduras conhecidas como a *Saccharomyces cerevisiae* (BORZANI, 2001). Porém, as quantidades de inibidores como furfural e hidroximetilfurfural se destacam, o que dificulta a fermentação, inibindo a ação das leveduras. Mas a maior interferência, neste hidrolisado, é o ácido acético, pois possui quantidade superior às citadas na literatura (FERREIRA, 2010; MEDINA, 2013; FONSECA, 2011; RABELO, 2010).

No pré-tratamento do bagaço por explosão a vapor, todos os componentes da biomassa sofrem hidrólise, porém as hemiceluloses são as mais sensíveis a este tipo de reação. Com a ação da temperatura e da pressão do vapor, os grupos acetila presentes nas hemiceluloses são hidrolisados a ácido acético (PITARELO, 2013), o que justifica a alta concentração deste composto no hidrolisado usado neste estudo.

A Tabela 6 apresenta a composição de alguns hidrolisados, oriundos de cana-de-açúcar.

Tabela 6: Composição dos hidrolisados obtidos na literatura

Autor	Origem do Hidrolisado	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Arabinose (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)
Ferreira (2010)	Bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado em reator	10,1	76,7	2,9	8,8	0,02	0,01
Fugita (2010)	Bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado em reator	3,4	17,8	0,0	-	-	-
Rabelo (2010)	Bagaço de cana hidrolisado com hidróxido de cálcio	16,5	2,6	0,07	-	0,46	0,007
Rabelo (2010)	Bagaço de cana hidrolisado com peróxido de hidrogênio	23,8	6,5	0,04	-	0,02	0,004
Medina (2013)	Bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com ácido	7,0	63,37	2,9	6,9	0,03	0,01

Fonte: FERREIRA, 2010; FUGITA, 2010; RABELO, 2010; MEDINA, 2013

Conforme a Tabela 6, os trabalhos citados apresentam hidrolisados com quantidades de glicose menores do que o recebido pelo CTC, no entanto os valores de xilose são maiores. Outra característica é a concentração de ácido acético, em que todos apresentam quantidades inferiores à amostra com que está se trabalhando neste estudo.

Em sua maioria, os trabalhos realizados têm origem na hidrólise da biomassa. Nesta pesquisa a utilização do hidrolisado oriundo da indústria é um fator muito importante, pois ele não passou por processos de destoxificação para remoção dos contaminantes. Além disso, o processo industrial trabalha com grandes volumes, o que dificulta o controle de variáveis como agitação, pH, aeração e temperatura interferindo na homogeneidade do produto. Em escala laboratorial, o controle do processo é muito mais eficaz porque se trabalha com quantidades bem inferiores às da realidade industrial, além de se ter total domínio e controle das variáveis citadas.

Em comum, estes estudos apresentam valores parecidos de ácido acético, no entanto, são quantidades bem inferiores ao hidrolisado recebido do CTC, utilizado como substrato neste trabalho.

O hidrolisado recebido do CTC tem alto potencial de produção de etanol, pois é rico em glicose, carboidrato de fácil quebra e componente importante para a fermentação alcoólica, todavia possui compostos inibidores da fermentação alcoólica como o ácido acético, o furfural e o hidroximetilfurfural, em quantidades relevantes.

Levando-se em consideração que o hidrolisado possui alto teor de açúcares, foram realizados alguns ensaios preliminares com o hidrolisado original, no entanto não se obteve sucesso (dados não mostrados). Assim, com as quantidades elevadas de inibidores e baseando-se nas quantidades de açúcares apresentadas na literatura, escolheu-se diluir o hidrolisado na proporção 1:3 v/v, em água ultrapura, para iniciar os testes fermentativos.

4.2 ENSAIOS PRELIMINARES PARA SELEÇÃO DE LEVEDURAS

Utilizaram-se quatro leveduras para os ensaios iniciais: *UFFS-CE-3.1.2*, *UFFS C3.6*, *MAF CE 4AE.9* e *FLONA C3.4*. Estas foram testadas com o meio suplementado e diluído na proporção 1:3 v/v. Estudos com hidrolisados de material lignocelulósico realizaram fermentação com valores de glicose em torno de 10, 7, 1 e 13 g/L (FERREIRA, 2010; MEDINA, 2013; FONSECA, 2011; RABELO, 2010). Por se tratar de leveduras novas, com pouca ou nenhuma

informação na literatura, não é possível afirmar qual açúcar as leveduras utilizariam como fonte de carbono, pois elas poderiam utilizar tanto a glicose como a xilose ou os dois carboidratos concomitantemente. Desta forma, diluindo-se o meio nesta proporção, a concentração de açúcares fermentescíveis ficou em torno de 18 g/L, aproximadamente 11 g/L de glicose, que vai ao encontro dos valores citados, e 7 g/L de xilose. Também cabe lembrar que esta diluição auxilia na diminuição da concentração de ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural. Assim, é possível analisar, inicialmente, o comportamento dos micro-organismos testados em relação a uma menor concentração deste inibidor.

Para não se adicionar etapas ao processo, pretendeu-se trabalhar próximo da realidade industrial, e testar o potencial das leveduras no hidrolisado bruto, portanto não se realizou ajuste de pH. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Tabela 7, sendo que o pH inicial e final permaneceu entre 4,9 e 5. Nesta etapa foram quantificados os açúcares principais como glicose e xilose. Também foram avaliadas as concentrações de celobiose e arabinose, além da quantificação de etanol produzido. Dentre os inibidores houve o monitoramento da concentração de ácido acético, objetivo deste estudo.

Tabela 7: Resultados da fermentação com os micro-organismos selecionados.

Tempo	Micro-organismo	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	Xilose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Celobiose (g/L)	Arabinose (g/L)
24 horas	<i>UFFS-CE-3.1.2</i>	9,37	1,30	6,30	2,41	1,54	0,32
	<i>UFFS C 3.6</i>	11,71	0,00	7,00	2,82	1,83	0,29
	<i>MAF CE 4 AE.9</i>	11,30	0,00	6,70	2,49	1,80	0,29
48 horas	<i>FLONA C 3.4</i>	12,16	0,00	7,30	2,68	1,83	0,32
	<i>UFFS-CE-3.1.2</i>	1,16	7,00	6,20	2,33	1,39	0,26
	<i>UFFS C 3.6</i>	11,00	0,00	6,50	2,48	1,72	0,25
72 horas	<i>MAF CE 4 AE.9</i>	11,77	0,00	7,00	2,62	1,85	0,30
	<i>FLONA C 3.4</i>	11,60	0,00	6,90	2,59	1,80	0,30
	<i>UFFS-CE-3.1.2</i>	0,00	11,60	9,00	2,57	1,41	0,22
72 horas	<i>UFFS C 3.6</i>	10,93	0,00	6,50	2,48	1,67	0,28
	<i>MAF CE 4 AE.9</i>	11,50	0,00	6,80	2,54	1,77	0,30
	<i>FLONA C 3.4</i>	11,95	0,00	7,10	2,68	1,77	0,30

Fonte: Autor, 2017.

Dos micro-organismos testados, apenas um se destacou, a levedura *UFFS-CE-3.1.2*, pois foi a que apresentou produção de etanol. Analisando-se a quantidades iniciais de glicose e xilose no hidrolisado pode-se observar que a xilose permaneceu constante, logo, o açúcar utilizado para a fermentação foi a glicose, fato já relatado na literatura por Silva (2009). À medida que a concentração de etanol aumenta a quantidade de glicose diminui chegando a zero, pois a glicose, por ser uma hexose, fonte de carbono universal, é metabolizada por todos micro-organismos, além de estar presente em maior quantidade.

A xilose não foi consumida, logo, é possível que o metabolismo deste sacarídeo tenha sido afetado pelo ácido acético, que permaneceu constante, do que se pode afirmar que as leveduras são resistentes a este composto na faixa de concentração avaliada. Estudo de Ferreira (2010) fermentou hidrolisado de cana-de-açúcar, destoxificado e suplementado, com as quantidades de 10,14 g/L de glicose, 76,06 g/L de xilose, 2,92 g/L de ácido acético e 8,87 g/L de arabinose e somente após 156 horas de fermentação com a levedura *Pichia stipitis* UFMG –IMH 43.2 atingiu 11 g/L de etanol. No ensaio realizado no presente trabalho obteve-se 11 g/L de etanol em apenas 72 horas de fermentação.

Medina (2013) avaliou a agitação, o pH e a aeração com hidrolisado de cana-de-açúcar utilizando a levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 e na melhor condição, com 63,37 g/L xilose, 7,04 g/L de glicose, 6,95 g/L de arabinose e 2,91 g/L de ácido acético, alcançou 7,34 g/L de etanol. Empregando *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, Fonseca (2011) fermentou um hidrolisado com 70 g/L de xilose, 1,22 g/L de glicose e 4,38 g/L de ácido acético e obteve 7 g/L de etanol.

Outro fator a ser destacado foram as concentrações de celobiose e arabinose, que se mantiveram constantes, levando à hipótese de que as leveduras testadas não utilizam estes compostos para a fermentação alcoólica, fato relatado por Medina (2013). Pode-se também supor que pelo fato de as concentrações de arabinose, celobiose e xilose terem permanecido constantes tenha ocorrido inibição da levedura pela presença de ácido acético (PALMQVIST, 1999).

Os casos citados possuem, em comum, a alta concentração de xilose e quantidade de ácido acético com valores próximos deste trabalho. As quantidades de etanol produzidas também se aproximam deste ensaio, mas com condições melhoradas, como pH, agitação, aeração e preparo do hidrolisado com destoxificação ou aumento da concentração de açúcares.

Pesquisa de Rabelo (2010) fermentou, em reator, com *Saccharomyces cerevisiae*, mosto com 60% de hidrolisado pré-tratado,

resultando em um meio com 13,172 g/L de glicose, 0,867 g/L de xilose e 0,972 g/L de ácido acético e obteve 7 g/L de etanol. Outro estudo que revelou baixa quantidade de etanol foi o de Fugita (2010), quando testou as leveduras *Candida guilliermondii* (CG), *Rhodotorula glutinis* (J10) e *Rhodotorula minuta* (J19.1) em hidrolisado com 9,87 g/L de glicose e 47,71 g/L de xilose, na ausência de ácido acético, e obteve apenas 2,33 g/L de etanol.

As pesquisas citadas relatam a produção de etanol com leveduras já conhecidas na literatura, porém todas destoxificam o hidrolisado, fermentando-o com valores de ácido acético muito inferiores ao testado neste ensaio e mesmo assim, não obtiveram resultados promissores em termos de produção de etanol.

Os casos que obtiveram maiores concentrações de etanol trabalharam com o meio rico em xilose, com quantidades superiores a 60 g/L, conduzindo a fermentação com valores maiores ao proposto neste ensaio, que foi de 6 g/L. Em relação à quantidade de ácido acético, os trabalhos citados possuem concentrações próximas ou menores que este, o que sugere que a levedura *UFFS-CE-3.1.2* apresenta alto potencial para produção de etanol na presença de inibidores e com concentrações de açúcares fermentescíveis, em torno de 18 g/L (glicose + xilose), valores inferiores aos citados na literatura. Desta forma a identificação da levedura se torna importante.

4.2.1 Identificação da levedura

As cepas avaliadas neste trabalho foram enviadas ao Instituto Biológico de São Paulo para identificação. A cepa da levedura *UFFS-CE-3.1.2* apresentou similaridade genética com as espécies *Candida intermedia* ou *Candida pseudointermedia*, porém não apresentou 100 % de identidade em nenhum dos sequenciamentos, e de fato, não se pode concluir que se trata dessas espécies.

De acordo com a identificação, a sequência genética desta cepa é
 ACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGC
 TCAAATTTGAAATCCTTCGGGAGTTGTAATTTGTAGTTGGGA
 GACCCCGCGGCTAGTGGCACCAAGTCCCTTGAACAGGGCGC
 CTTAGAGGGTGAGAGCCCCGTAGGTACCACAACACCGTCTTG
 TGTCTCCTCTCCAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCA
 AAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGA
 GACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGC
 ACTTTGAAAAGAGAGTGAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAG
 GGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGCCTTCGTGCCGGGCCAGC

ATCGGTTGCTAGGGGTGGATAAGGAACAAGGAATGTAGCTCC
TCGGAGTATTATAGCCTTGC GCGATACCCACTGGCGACCG
AGGCCTGCGGTATTCCTACCTAGGATGCTGGCGTAATGGTTG
CAAGCCGCCCGTCTTGA AACACGGACCAAGGAGTCTAACGTC
TATGCGAGTGT TTTGGGTGGATAAAACCCCAGCGCGGAATGAA
AGTAAGAGGTTGGAGCCCGCATGGGCGCACAATCGACCGACC
CAGAAGTTTACGGACGGGTTTGAGTAGGAGCATAGCTGTTGG
GACCCGAAAGATGGTGA ACTATACTGGATAGGGTGAAGCCA
GAGGAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCGGTTCTGACGTGCAA
ATCGATCGTCGAATCTGGGTATAG GGGCGAA.

Cabe ressaltar, que por se tratar de uma cepa nova, esta identificação não é definitiva e, portanto, trata-se de uma espécie ainda não descrita pela literatura, motivo pelo qual continuará a ser chamada no decorrer deste trabalho pelo nome usual de *UFFS-CE-3.1.2*.

Levando-se em conta que este micro-organismo produziu etanol na presença de ácido acético mostrando-se promissor, é necessário avaliar o potencial do meio fermentativo bem como avaliar o aumento da concentração de glicose a fim de verificar se ocorre aumento da produção de etanol. Como o hidrolisado não foi submetido à remoção de contaminantes, ao se aumentar a concentração de hidrolisado no substrato irá se elevar a quantidade de inibidores, o que é de interesse também. Sendo assim optou-se por fazer um planejamento tipo Plackett-Burman com a finalidade de se avaliar os efeitos da composição do meio, analisar a influência da diluição, a produção de etanol com quantidades maiores de açúcares, a adição de suplementos ao meio, bem como se o aumento da concentração de ácido acético afetará a ação da levedura que demonstrou ser eficaz.

4.3 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO E DILUIÇÃO COM O PLANEJAMENTO DE PLACKETT-BURMAN (P&B)

Foi realizado o planejamento P&B conforme descrito na matriz apresentada na tabela 8, com a finalidade de investigar o efeito das diluições e da suplementação durante a fermentação. Optou-se por realizar este ensaio sem ajuste do pH para verificar o comportamento da levedura. Os resultados do planejamento com a levedura *UFFS-CE-3.1.2* estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados do planejamento P&B com a levedura UFFS-CE-3.1.2

Amostra	Variáveis					24 horas						48 horas						72 horas					
	X ₁ (Diluição) v/v	X ₂ (NH ₄ SO ₄) g/L	X ₃ (MgSO ₄) g/L	X ₄ (KH ₂ PO ₄) g/L	X ₅ (Ex. Levedura) g/L	Gli. (g/L)	Et. (g/L)	Xi. (g/L)	Ac. Ac. (g/L)	Ce. (g/L)	Ar. (g/L)	Gli. (g/L)	Et. (g/L)	Xi. (g/L)	Ac. Ac. (g/L)	Ce. (g/L)	Ar. (g/L)	Gli. (g/L)	Et. (g/L)	Xi. (g/L)	Ac. Ac. (g/L)	Ce. (g/L)	Ar. (g/L)
01	+1 (bruto)	-1 (0,0)	+1 (0,8)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	43,43	0,00	26,20	8,95	6,12	0,96	44,34	0,00	26,80	9,05	6,09	0,87	43,76	0,00	27,00	8,80	6,04	0,97
02	+1 (bruto)	+1 (9,0)	-1 (0,0)	+1 (10,0)	-1 (0,0)	42,98	0,00	25,10	8,90	5,46	0,96	43,74	0,00	26,00	8,91	5,71	0,87	38,81	0,00	23,10	7,98	5,08	0,87
03	-1 (1:3)	+1 (9,0)	+1 (0,8)	-1 (0,0)	+1 (6,0)	10,95	0,70	7,50	2,77	1,95	0,33	5,55	4,20	6,80	2,61	1,82	0,23	4,10	8,00	6,60	2,57	2,04	0,24
04	+1 (bruto)	-1 (0,0)	+1 (0,8)	+1 (10,0)	-1 (0,0)	43,7	0,00	25,70	9,02	5,49	0,98	44,09	0,00	25,90	9,03	5,70	0,87	41,60	0,00	24,60	8,61	5,31	0,93
05	+1 (bruto)	+1 (9,0)	-1 (0,0)	+1(10,0)	+1 (6,0)	41,72	0,00	23,50	8,69	5,26	0,92	42,11	0,00	24,20	8,76	5,41	0,81	42,47	0,00	24,50	8,86	5,44	0,95
06	+1 (bruto)	+1 (9,0)	+1 (0,8)	-1 (0,0)	+1 (6,0)	43,14	0,00	25,90	8,81	6,03	0,96	44,60	0,00	27,20	9,12	6,09	0,91	42,10	0,00	25,80	8,58	5,87	0,95
07	-1 (1:3)	+1 (9,0)	+1 (0,8)	+1 (10,0)	-1 (0,0)	11,1	0,50	7,00	2,62	1,72	0,30	9,44	1,80	7,10	2,61	1,69	0,24	2,84	6,80	7,40	2,66	1,77	0,25
08	-1 (1:3)	-1 (0,0)	+1 (0,8)	+1 (10,0)	+1 (6,0)	10,32	0,60	6,60	2,52	1,53	0,23	9,20	1,60	6,80	2,57	1,63	0,22	1,34	7,40	6,70	2,58	1,62	0,24
09	-1 (1:3)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	+1 (10,0)	+1 (6,0)	10,94	0,40	6,90	2,64	1,8	0,28	8,02	2,30	6,70	2,56	1,63	0,22	0,57	7,70	6,40	2,50	1,80	0,25
10	+1 (bruto)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	-1(0,0)	+1 (6,0)	43,12	0,00	25,00	8,97	6,05	0,94	44,26	0,00	25,70	9,16	6,24	0,87	42,2	0,00	24,50	8,79	6,04	0,94
11	-1 (1:3)	+1(9,0)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	10,89	0,40	7,10	2,61	1,81	0,29	7,92	2,50	6,80	2,61	2,21	0,24	0,72	8,00	6,90	2,54	1,99	0,23
12	-1 (1:3)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	11,04	0,30	7,20	2,56	1,75	0,32	8,01	2,80	7,40	2,63	2,27	0,24	0,56	7,60	6,50	2,41	2,15	0,22
13	0 (1:1)	0 (4,5)	0 (0,4)	0 (5,0)	0 (3,0)	20,36	0,00	12,30	4,36	2,75	0,49	21,91	0,00	13,30	4,7	3,30	0,46	21,26	0,00	13,20	4,54	2,96	0,52
14	0 (1:1)	0 (4,5)	0 (0,4)	0 (5,0)	0 (3,0)	21,63	0,00	13,10	4,65	2,88	0,50	21,91	0,00	13,30	4,67	2,97	0,45	21,26	0,20	13,30	4,59	3,27	0,51
15	0 (1:1)	0 (4,5)	0 (0,4)	0 (5,0)	0 (3,0)	20,53	0,00	12,90	4,53	2,78	0,49	22,09	0,00	13,70	4,62	3,00	0,48	20,88	0,80	13,60	4,57	2,99	0,54

Fonte: Autor, 2017 - Gli.: glicose; Et.: etanol; Xi.: xilose; Ac. Ac.: ácido acético; Ce.: celobiose; Ar.: arabinose.

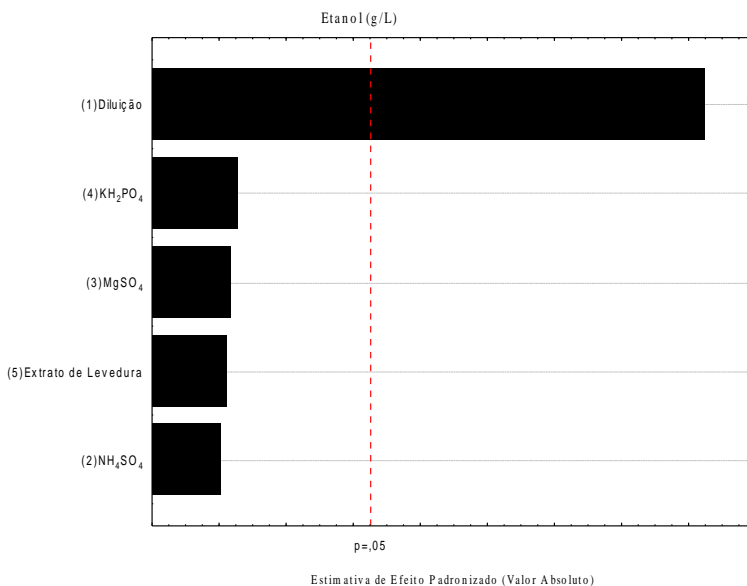
Avaliando-se os resultados da Tabela 8, percebe-se que a xilose, o ácido acético, a celobiose e a arabinose novamente se mantiveram constantes; fatos semelhantes já foram citados por Rabelo (2010). Nas amostras com maiores concentrações de ácido acético não houve produção de etanol. Estudos comprovam que a redução da produção de etanol com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* chegou a 74% quando a concentração de ácido acético no meio era de 6 g/L (PALMQVIST, 1999). Comparando-se estes dados com os resultados do planejamento, pode-se afirmar que ao utilizar o hidrolisado bruto, com maior concentração de ácido acético, ocorre a inibição da ação da levedura, o que a impede de metabolizar a glicose para produzir etanol. Também se pode afirmar que nos ensaios utilizando o hidrolisado bruto, o crescimento da levedura foi afetado pela alta concentração de açúcares, situação apresentada por Ferreira (2010).

Nas amostras que estavam com maior diluição, 1:3 v/v, houve produção de etanol, porém, mesmo após 72 horas de fermentação, a glicose ainda não havia sido totalmente consumida, o que demonstra uma tendência para aumentar o tempo da fermentação e consequentemente o aumento da quantidade de etanol produzida.

Desta forma, pode-se perceber que a amostra 12 se destacou pois, sem adição de nutrientes, somente com o hidrolisado diluído, produziu 7,6 g/L de etanol. Assim, esta foi a melhor condição obtida até aqui.

Os efeitos das variáveis do planejamento de Plackett-Burman, para a produção de etanol em 72 horas foram avaliados pelo gráfico de Pareto, conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7: Estimativa dos efeitos, ao nível de 95% de confiança, através do gráfico de Pareto, da variável resposta concentração de etanol em 72 horas de fermentação.



Fonte: Autor, 2017.

Conforme o gráfico de Pareto da Figura 7 observa-se que para o planejamento de Plackett-Burman adotado a diluição apresenta efeito significativo, sendo que nas demais variáveis analisadas a suplementação não é significativa. Mesmo em ordem de significância o fator determinante para a fermentação é a diluição. Desta forma há uma tendência para que com aumento da diluição a quantidade de etanol produzida também aumente.

Por se tratar de uma levedura ainda desconhecida, é importante a realização de outros estudos para se conhecer melhor as necessidades da levedura, o que não é objetivo deste trabalho.

Com o objetivo de se confirmar a variável que se apresentou significativa neste teste foi realizado um ensaio adicional aumentando-se o fator de diluição e o tempo de fermentação, conforme apresentado a seguir.

4.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO AUMENTO DO FATOR DE DILUIÇÃO E DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO

A Tabela 9 apresenta os resultados para o ensaio com o micro-organismo considerado promissor *UFFS-CE-3.1.2*. Nesta etapa foi aumentado o fator de diluição para a proporção 1:5 v/v e o tempo de fermentação para 96 horas. A levedura foi avaliada nas condições apresentadas comparando-se a quantidade de etanol produzida com o meio diluído nas proporções 1:3 e 1:5 v/v, com e sem adição de nutrientes para a fermentação.

Tabela 9: Resultados da fermentação com o aumento do tempo de fermentação e do fator de diluição do meio

Tempo (horas)	Diluição(v/v) – Suplementação	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	Xilose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Celobiose (g/L)	Arabinose (g/L)
24	1:3 - Suplementado	10,60	0,70	6,70	2,57	1,61	0,30
	1:3 - Não suplementado	10,80	0,70	7,30	2,65	1,83	0,26
	1:5 - Suplementado	5,43	1,20	4,30	1,83	1,16	0,20
	1:5 - Não suplementado	5,89	1,00	4,40	1,81	1,22	0,15
48	1:3 - Suplementado	9,53	1,10	6,60	2,76	1,82	0,28
	1:3 - Não suplementado	9,48	1,10	7,00	2,58	1,76	0,30
	1:5 - Suplementado	2,61	3,20	4,20	1,85	1,14	0,21
	1:5 - Não suplementado	2,03	3,70	4,40	1,84	1,25	0,19
72	1:3 - Suplementado	1,92	6,30	6,30	2,34	1,54	0,24
	1:3 - Não suplementado	2,50	6,00	6,40	2,4	1,71	0,21
	1:5 - Suplementado	0,00	5,20	4,20	1,81	1,17	0,19
	1:5 - Não suplementado	0,00	5,30	4,30	1,85	1,25	0,17
96	1:3 - Suplementado	0,00	8,00	6,40	2,51	1,58	0,19
	1:3 - Não suplementado	0,00	8,10	6,50	2,43	1,78	0,21
	1:5 - Suplementado	0,00	5,10	4,00	1,76	1,14	0,17
	1:5 - Não suplementado	0,50	5,20	4,20	1,77	1,23	0,14

Fonte: Autor, 2017. Concentração dos nutrientes adicionados: NH_4SO_4 : 4,5 g/L; MgSO_4 : 0,4 g/L; KH_2PO_4 : 5 g/L; Extrato de levedura: 3 g/L

Neste ensaio a levedura *UFFS-CE-3.1.2* manteve a maior produção de etanol com a diluição do meio na proporção 1:3. Os valores da fermentação em 72 horas se aproximaram dos dados obtidos no planejamento, pois a quantidade de etanol estava em torno de 7 g/L e ainda havia glicose para ser metabolizada, fato que se repetiu neste ensaio conforme é demonstrado na Tabela 9. Aumentando-se o tempo de fermentação para 96 horas, a glicose ainda não foi totalmente consumida e a concentração de etanol foi maior, atingindo 8 g/L para o meio suplementado e de 8,1 g/L para o meio não suplementado, confirmando, novamente, que a suplementação do meio não é fator significativo.

Com o aumento da diluição do hidrolisado para a proporção 1:5 v/v a quantidade de etanol produzida foi de 5,1 g/L para o meio com suplementação e de 5,2 g/L com o meio não suplementado. Este resultado corrobora para a conclusão de que a levedura *UFFS-CE-3.1.2* apresentou bom desempenho, sendo eficiente para produção de etanol 2 G na presença de ácido acético, mesmo sem adição de suplementos ao processo fermentativo.

Mesmo após 96 horas de fermentação, na amostra com diluição 1:5 v/v ainda havia glicose, o que indica que a levedura não conseguiu consumir este açúcar nesta condição. A maior concentração de etanol foi produzida pela amostra com diluição 1:3 v/v e sem adição de suplementos, do que se pode dizer, pelos resultados apresentados, que a melhor condição em relação à diluição do meio é 1:3 v/v, confirmando os resultados obtidos no planejamento.

O micro-organismo *UFFS-CE-3.1.2* apresentou bons resultados nos ensaios realizados na presença de ácido acético sem ajuste de pH utilizando-se o meio diluído 1:3 v/v. Assim, antes de realizar a cinética, optou-se por testar o comportamento desta levedura em relação ao pH do substrato. Realizou-se um teste com o meio diluído 1:3 v/v, com e sem adição de suplementos à fermentação e com ajuste de pH inicial para 7 em todas as amostras. Nesta fase os ensaios foram realizados em duplicata para confirmação dos resultados obtidos, conforme é exibido na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados para fermentação com a levedura UFFS-CE-3.1.2 com ajuste de pH do meio.

Tempo (horas)	Amostra	Suplementação	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	Xilose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Celobiose (g/L)	Arabinose (g/L)
0	A	Sem suplementação	11,26	0,00	21,30	2,41	3,21	0,26
	B	Com suplementação	10,80	0,00	20,80	2,64	1,53	0,23
24	1A	Sem suplementação	9,52	0,90	21,30	2,67	1,99	0,33
	2A		9,36	0,70	21,00	2,07	1,79	0,29
	3B	Com suplementação	6,37	1,40	19,40	1,10	1,42	0,37
	4B		5,81	1,30	18,80	1,17	1,26	0,23
48	1A	Sem suplementação	8,84	1,10	20,90	2,86	2,81	0,20
	2A		8,35	1,10	20,80	2,64	2,94	0,36
	3B	Com suplementação	4,47	2,10	19,00	2,59	1,56	0,24
	4B		4,76	2,10	19,30	2,84	1,35	0,27
72	1A	Sem suplementação	8,56	1,00	21,20	2,68	3,35	0,26
	2A		8,33	1,10	21,10	2,56	2,08	0,34
	3B	Com suplementação	4,14	2,20	19,40	2,73	1,58	0,27
	4B		4,25	2,10	19,50	2,85	1,32	0,28
96	1A	Sem suplementação	8,00	1,10	20,80	2,8	3,28	0,32
	2A		8,20	1,10	21,10	2,52	2,78	0,26
	3B	Com suplementação	4,12	2,30	19,60	3,03	1,51	0,26
	4B		3,87	2,50	19,20	2,79	1,29	0,26

Fonte: Autor, 2017

O pH inicial de todas as amostras foi ajustado para 7. Ao final o pH diminuiu em todas as amostras, como é demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de pH no início e após 96 horas de fermentação

Amostra	Suplementação do meio	pH inicial	pH final
1	Suplementado	7,00	5,11
2		7,00	5,28
3	Não	7,00	4,69
4	suplementado	7,00	4,67

Fonte: Autor, 2017.

Analisando-se os resultados obtidos nas Tabelas 10 e 11 pode-se afirmar que o ajuste de pH não aumenta a produção de etanol, além disso reduziu ao término da fermentação e as quantidades de etanol produzidas não foram relevantes. Comparando-se estes resultados aos testes realizados sem ajuste de pH cabe ressaltar que o micro-organismo não conseguiu consumir a glicose, pois ao final das 96 horas de reação ainda havia grande quantidade deste açúcar, e não houve aumento da concentração de etanol a partir de 72 horas. Outro fato que deve ser destacado é que as quantidades de etanol produzidas nesta fase foram menores em relação as quantidades obtidas nos testes preliminares e no planejamento P & B. Corrigindo-se o pH do meio não aumentou a quantidade de etanol produzida. Essa característica favorece o aumento de escala, pois não se adiciona custos com ajuste de pH, reduzindo uma etapa, viabilizando-o industrialmente.

Os valores de concentração de celobiose, arabinose, xilose e ácido acético se mantiveram constantes, mantendo o perfil da levedura de utilizar somente a glicose como substrato para a produção de etanol.

Após esses ensaios torna-se relevante estudar a cinética da fermentação. Optou-se por realizar a avaliação cinética com a levedura *UFFS-CE-3.1.2*, com o meio que apresentou o melhor resultado diluído na proporção 1:3 v/v, com dois ensaios: com ajuste de pH para 7 e sem ajuste de pH. Como já comprovado, a suplementação do meio não interfere na produção de etanol, desta forma o meio de condução da fermentação não foi suplementado. Porém, em relação ao pH do meio, apenas este ensaio não é conclusivo, por isso optou-se por realizar uma cinética com ajuste de pH.

Cabe ressaltar também que devido ao fato deste trabalho ter várias etapas e todas com quantidades consideráveis de amostras, não foi possível realizar testes em triplicata, porém o erro experimental não

foi superior a 10%, fato que pode ser observado com a obtenção de valores próximos, quando trabalhado em condições similares, como nos ensaios preliminares, planejamento e teste com aumento do fato de diluição e tempo de fermentação.

4.5 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO

Na avaliação cinética analisou-se a concentração de glicose, xilose, celobiose, arabinose, ácido acético e etanol em função do tempo. Conduziu-se a fermentação retirando-se amostras a cada seis horas para análise dos componentes em HPLC. A cada 24 horas foram determinados os valores de biomassa seca, furfural e hidroximetilfurfural.

As quantidades de furfural, hidroximetilfurfural e biomassa estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12: Valores da biomassa, furfural e HMF em intervalos de 24 horas durante cinética.

Tempo (h)	A – sem ajuste de pH			B – com ajuste de pH		
	Biomassa (g)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	Biomassa (g)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)
0	2,67	0,07	0,03	1,78	0,04	0,07
24	1,82	0,02	0,08	1,62	0,01	0,06
48	2,74	0,01	0,08	1,85	0,01	0,06
72	3,94	0,03	0,08	2,60	0,00	0,04
96	4,03	0,00	0,04	1,99	0,01	0,04
120	3,88	0,01	0,05	1,91	0,01	0,06
144	2,20	0,01	0,04	5,26	0,01	0,04
168	2,07	0,01	0,05	2,55	0,01	0,05
192	2,42	0,01	0,05	4,56	0,00	0,05

Fonte: Autor, 2017.

Nos dois ensaios A, sem ajuste de pH, e B, com ajuste de pH, a concentração de furfural diminuiu, o que pode ser uma característica desta levedura. Estudo de Fonseca (2009) avaliou o tratamento biológico em hidrolisado de cana-de-açúcar empregando leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 e obteve resultados promissores em relação às concentrações de furfural e hidroximetilfurfural, chegando a atingir 25 % de redução de inibidores totais. Desta forma, para se afirmar que a levedura *UFFS-CE-3.1.2* possui capacidade de remoção de inibidores

sendo necessária uma análise mais detalhada deste comportamento, o que não é objetivo deste trabalho.

Ainda assim, com base nos resultados obtidos, é possível sugerir que os inibidores furfural e hidroximetilfurfural tenham interferido parcialmente na fermentação. Estudos realizados por Delgenes *et al.* (1996) apontam que 2,0 g/L de furfural e 3 g/L de HMF podem reduzir a produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* em até 89 % e 93 % respectivamente. Logo, mesmo estes compostos estando presentes em baixas quantidades, eles podem ter inibido o metabolismo da levedura utilizada.

Em relação ao hidroximetilfurfural, os resultados se mostraram contrários, pois houve um pequeno aumento na amostra A, no qual não foi realizado ajuste de pH. Esse inibidor é gerado quando as pentoses e hexoses são degradadas, o que pode ter ocorrido durante a cinética, já que somente a glicose foi utilizada para geração de etanol (PALMQVIST *et al.*, 1999). Já no ensaio B, houve um decréscimo ao final da fermentação, dado que vai ao encontro do que ocorreu com o furfural.

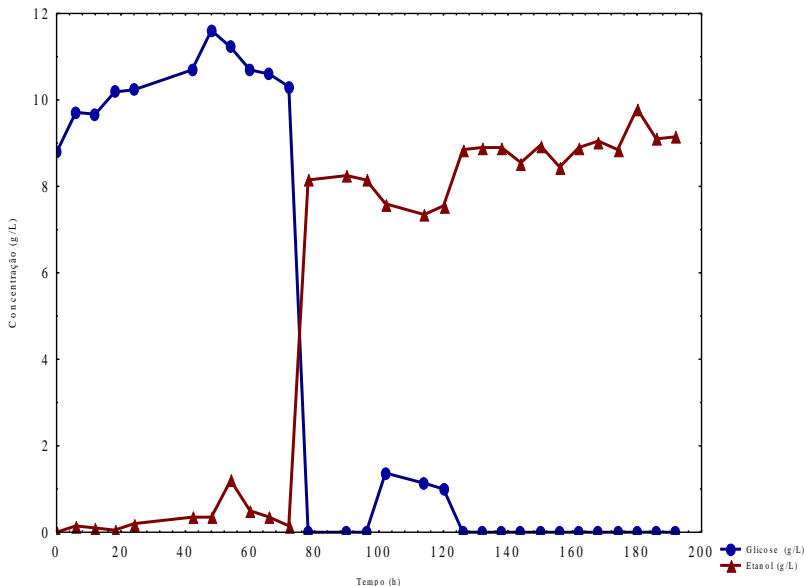
No que se refere à biomassa, a amostra A apresentou um aumento até o terceiro dia, 72 horas, se manteve constante até o quinto dia, 120 horas, o que coincide com a diminuição da concentração de glicose e produção de etanol, e pode ser caracterizada como a fase exponencial de uma fermentação. Após este período, os dados apresentam uma diminuição da biomassa indicando a morte dos micro-organismos, fase de desaceleração em um processo fermentativo. Esse comportamento é considerado comum em fermentações, processos que utilizam micro-organismos para obtenção de produtos de interesse (BORZANI *et al.*, 2001).

A biomassa da amostra B, mesmo não apresentando a maior produção de etanol, demonstrou um aumento constante até o sétimo dia, 144 horas, fator que coincide com a maior quantidade de etanol produzida e consumo total de glicose, depois disto se inicia a fase de desaceleração.

4.5.1. Produção de etanol e consumo de substrato

O consumo de glicose e a geração de etanol para o ensaio A, sem ajuste de pH, está apresentado no gráfico da Figura 8.

Figura 8: Gráfico do consumo de glicose e produção de etanol para ensaio A – sem ajuste de pH

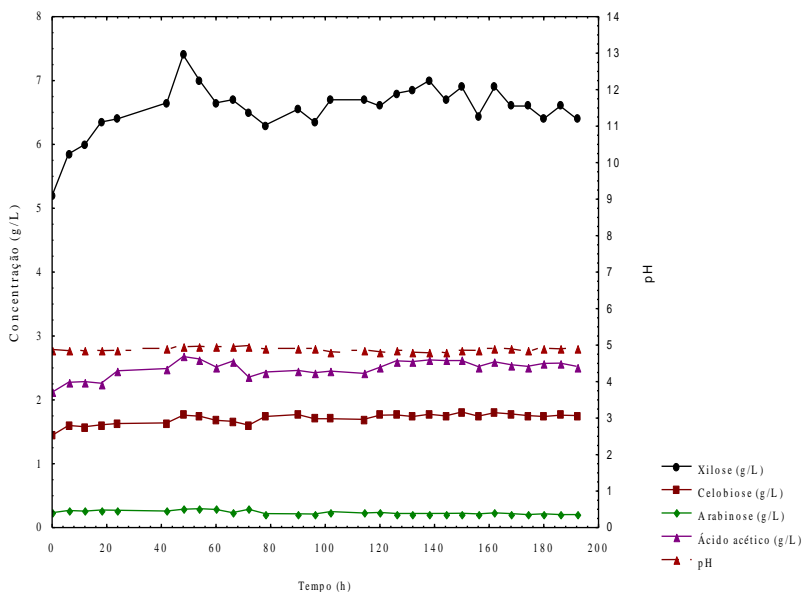


Fonte: Autor, 2017

Conforme se verifica na Figura 8 a glicose foi totalmente consumida em 72 horas na cinética da amostra, indo ao encontro do comportamento do crescimento da biomassa. A concentração de etanol produzido atinge 9,8 g/L, tendo uma pequena diminuição ao final, o que pode indicar consumo do produto pela levedura diante da escassez de glicose no meio de fermentação.

A Figura 9 descreve a variação das concentrações de xilose, celobiose, arabinose, ácido acético e pH para ensaio com amostra A.

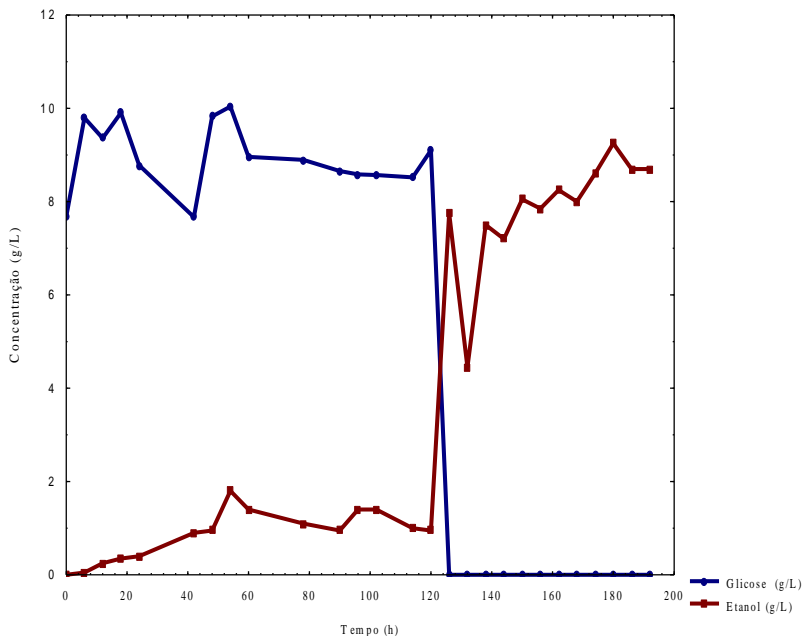
Figura 9: Gráfico da variação de xilose, celobiose, arabinose, ácido acético e pH para ensaio A – sem ajuste de pH



Fonte: Autor, 2017

Nas Figuras 10 e 11 estão apresentados os gráficos de consumo de glicose e produção de etanol e a variação das concentrações de xilose, celobiose, arabinose, ácido acético e pH para ensaio com amostra B, com ajuste de pH, respectivamente.

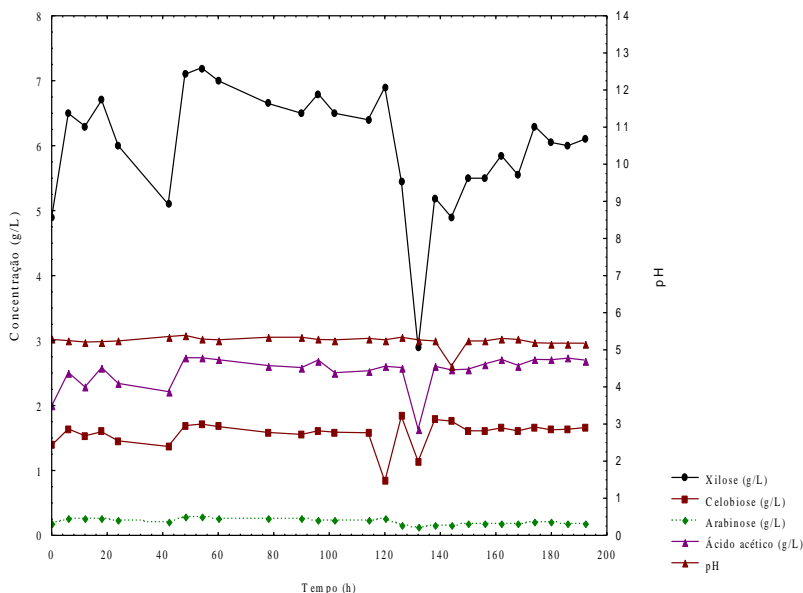
Figura 10: Gráfico do consumo de glicose e produção de etanol para ensaio B – com ajuste de pH



Fonte: Autor, 2017

Neste caso a quantidade de etanol produzida foi de apenas 8,7 g/L sendo que a glicose levou 126 horas para ser totalmente consumida, corroborando com o crescimento da biomassa que ocorreu até 144 horas. Em relação às concentrações de xilose, celobiose, arabinose, ácido acético e pH é possível perceber que a xilose e a celobiose novamente variaram suas concentrações, apresentando um aumento da concentração de xilose e uma pequena diminuição da quantidade de celobiose ao final da cinética, comportamento que também ocorreu com a amostra A sem ajuste de pH.

Figura 11: Gráfico da variação de xilose, celobiose, arabinose, ácido acético e pH para o ensaio B – com ajuste de pH



Fonte: Autor, 2017

Nos dois ensaios o ácido acético se manteve constante, e não interferiu o metabolismo da glicose, porém pode ter interferido o consumo dos demais açúcares, conforme mencionado nos ensaios anteriores. Esse fato pode ser confirmado retirando-se o ácido acético do meio, o que também não caracteriza o objetivo deste trabalho.

Cabe ressaltar aqui, que os dados obtidos nas cinéticas realizadas, apresentados nos gráficos, não foram tratados, e demonstram o real perfil do micro-organismo durante as fermentações. Como conclusões dos ensaios cinéticos, pode-se dizer que o ácido acético não interferiu no metabolismo da glicose, que foi totalmente consumida nos dois ensaios.

Em todos os ensaios foi utilizado somente o hidrolisado como substrato para fermentação. A quantificação dos açúcares e inibidores, glicose, xilose, celobiose, arabinose, furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético, foi baseada nos compostos encontrados na literatura, descritos no decorrer deste trabalho, considerados mais importantes e determinantes para o processo fermentativo. Porém, as informações

referentes ao hidrolisado foram poucas até a realização da cinética, apenas sabia-se que sua origem é da cana-de-açúcar. A informação de que o pré-tratamento do bagaço foi realizado por explosão a vapor foi obtida somente após a realização da cinética. Desta forma, pode-se supor que neste meio há inúmeros compostos, que não foram quantificados, e podem estar afetando nos resultados obtidos. Apesar disso, nos dois ensaios, A e B, foram obtidos bons rendimentos de etanol.

Como se utilizou uma levedura ainda não conhecida, com o hidrolisado bruto como substrato se fazem necessários outros ensaios para comprovar detalhadamente o comportamento deste micro-organismo. O que se pode afirmar, diante dos resultados obtidos até aqui, é que esta levedura possui capacidade de produzir etanol mesmo na presença de inibidores como o ácido acético, além de ainda não ter sido identificada. Este trabalho é, portanto, apenas uma etapa, de uma série de testes e ensaios necessários para descrever e definir o comportamento desta levedura buscando melhorar e aumentar a produção de etanol.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho produziu etanol de segunda geração a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, na presença de ácido acético sem submeter o meio à destoxificação. Para isso foram testados quatro micro-organismos isolados de materiais lignocelulósicos. Destes, a levedura *UFFS-CE-3.1.2* se destacou e produziu etanol mesmo na presença de ácido acético, e foi selecionada para realização estudo da composição do meio.

Pelo planejamento de Placket Burman foi avaliado o efeito da diluição e da suplementação do meio, sendo que a diluição do hidrolisado bruto se apresentou como a variável significativa, o que confirma que o hidrolisado recebido do CTC possui os nutrientes necessários para a ação da levedura testada não sendo necessário adicionar nutrientes para a levedura.

Em relação ao comportamento do micro-organismo, esta levedura apresentou os melhores resultados sem adição de nutrientes e sem ajuste de pH, o que contribui para o processo industrial, pois diminui custos com adição de etapas como ajuste de pH. Este resultado foi confirmado na cinética, quando a produção de etanol iniciou primeiramente no ensaio A sem ajuste de pH, em 72 horas, mantendo seu perfil, e somente após 120 horas de reação que o ensaio B com pH inicial ajustado produziu bioetanol.

O hidrolisado bruto é um bom substrato, pois possui os nutrientes necessários para a levedura metabolizar e viabiliza a produção de etanol de segunda geração. Mesmo na presença de inibidores como o ácido acético, a levedura *UFFS-CE-3.1.2* se mostrou promissora, apresentou afinidade com o substrato e produziu quantidade de etanol relevante, 9 g/L, não necessitando a adição de suplementos ao meio de fermentação, nem a remoção dos inibidores.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar a escala de experimentos testando-os em reator.
- Testar a levedura *UFFS-CE-3.1.2* em meio sintético e comparar com o hidrolisado.
- Avaliar a produção de etanol pela levedura *UFFS-CE-3.1.2* na ausência de ácido acético.
- Remover o ácido acético do hidrolisado recebido do CTC e testar as leveduras que não apresentaram produção de etanol neste trabalho.
- Verificar se o micro-organismo *UFFS-CE-3.1.2* metaboliza outros açúcares além da glicose, como xilose e arabinose.
- Quantificar separadamente carbono, nitrogênio para avaliar outra cinética.
- Avaliar se há sacarose no meio;
- Verificar se a produção de etanol com esta levedura supera o valor estequiométrico já obtido na literatura com outras leveduras.
- Ajustar os resultados da cinética a modelos matemático para se analisar o perfil do crescimento do micro-organismo, o consumo de substrato, formação de produto e inibição do micro-organismo.

7. REFERÊNCIAS

AMORIM, S. S. **Isolamento e caracterização de leveduras com potencial para a biorremediação do manganês**. Universidade Federal de Ouro Preto. Dissertação de mestrado. Ouro Preto, MG, 2014.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em <http://www.anp.gov.br>. Acessado em 19 de agosto de 2016.

ARAÚJO, G. J. F. **O Etanol de segunda geração e sua importância estratégica ante o cenário energético internacional contemporâneo**. Fórum Ambiental Da Alta Paulista. Volume 9, número 5, 2013.

BADINO, A. C. Jr.; CRUZ, A. J. G. ; GIORDANO, R. L. C.; ZANGIROLAMI, T. C. **Laboratório aberto de processos químicos: fermentação alcoólica e automação do processo de cultivo da levedura de panificação**. Universidade Federal de São Carlos. COBENGE, 2003.

BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. **Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol**. Progress in Energy and Combustion Science.v.47. p. 60-88, 2014.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. **Progress in bioethanol processing**. Progress in Energy and Combustion Science, v.34. p. 551 – 573, 2008.

BARBOSA, L. C. A. **Introdução à química orgânica**. 2º edição. São Paulo:Pearson Prentice Hall, 2011.

BARROS, E. M.; CARVALHO, V. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R.B. **Comparison of strategies for the simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to enhance cellulosic ethanol production**. Chemical Engineering Journal. V.307. p. 939–947, 2017.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial. Fundamentos**. Volume 1. Blucher: São Paulo, 2001.

CANDIDO, R. G. **Produção de membranas a partir do bagaço de cana-de-açúcar e sua utilização na detoxificação do hidrolisado hemicelulósico.** Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena. Tese de doutorado. Lorena, SP, 2015.

CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D Para Produtividade e Sustentabilidade.** SãoPaulo: Blucher, 2010.

COSTA, D. A. **Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico.** Universidade Federal de Ouro Preto. Dissertação de mestrado. Ouro Preto, MG, 2011.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M.. **Effects 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. p.220-225, 1996.

DOYLE, J. J. DOYLE, J. L. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** Phytochemical Bulletin v.19. p. 11-15; 1987.

FERRAZ, F. O. **Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar à xilitol e etanol.** Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Dissertação de Mestrado. Lorena, São Paulo, 2010.

FERREIRA, A. D. **Utilização da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** Escola de Engenharia de Lorena. Dissertação de mestrado. Lorena, SP, 2010.

FONSECA, B. G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis*.** Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena. Dissertação de mestrado, Lorena, SP, 2009.

FONSECA, B. G.; MOUTTA, R. O.; FERRAZ, F. O.; VIEIRA, E. R.; NOGUEIRA, A. S.; BARATELLA, B. F.; RODRIGUES, L. C.;

ZHANG, H.; SILVA, S. S. **Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast.** J Ind Microbiol Biotechnol. V.38. p.199–207, 2011.

FUGITA, T. P. L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.** Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Dissertação de mestrado. Jaboticabal, SP, 2010.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. **Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid.** Journal of Food Engineering, v. 74 p. 78–88, 2006.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. **Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. v. 41. p. 550-567. 2014.

HARMSEM, P. F. H.; HUIJEN, W.J. J.; LÓPEZ, L. M. Bermúdez; BAKKER, R. R. C. **Literature review of physical na chemical pre treatment processes for lignocellulosic for biomass.** Food & biobased researche, ECN, 2010.

HOSGUN, E. Z.; BERIKTEN, D.; KIVANÇ, M.; BOZAN, B. **Ethanol production from hazelnut shells through enzymatic saccharification and fermentation by low-temperature álcali pretreatment.** Fuel, v.196. p. 280–287, 2017.

KÁDÁR, Z. SZENGYEL, Z. RÉCZEY, K. **Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of etanol.** Industrial Crops and Products , v. 20. p. 103–110, 2003.

LEITE, R. C. **O etanol combustível no brasil. Biocombustíveis no Brasil: realidades e perspectivas.** 2007.

LUO, C.; BRINK, D. L.; BLANCH, H. W. **Identfication of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to etanol.** Biomass and Bioenergy. v. 22. p. 125-138, 2001.

MACEDO, I. C. **Balço das emissões de gases do efeito estufa na produção e uso do etanol no Brasil**. Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético, Universidade Estadual de Campinas, NIPE, Campinas, São Paulo, 2004.

MACHADO, C. M. M. **Microorganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, Distrito Federal: Embrapa, 2013.

MACHADO, C. M. M. **Produção de álcool combustível a partir de carboidratos**. Revista de Política Agrícola. nº 3. p. 64- 78, 2006.

MARTINS, G. M. **Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose**. Universidade Estadual Paulista. Dissertação de mestrado, São José do Rio Preto, SP, 2011.

MAYER, F. D.; BRONDANI, M.; HOFFMANN, R.; FERIS, L. A.; MARCILIO, N. R.; BALDO, V. **Small-scale production of hydrous ethanol fuel: Economic and environmental assessment**. Biomass and Bioenergy. v.93. p. 168-179, 2016.

MCMURRY, J. **Química orgânica**. Volume 1, São Paulo, 2011.

MEDINA, K. J. D. **Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL-Y-7124 e *Candida shehatae (Pichia) stipitis* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético**. Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado. Lorena, SP, 2013.

NAE, Cadernos. **Biocombustíveis**. Núcleo de Assuntos Estratégicos de Presidência da República. Brasília, 2005.

NOVACANA. NovaCana .Disponível em <https://www.novacana.com>. Acessado em 20 de setembro de 2016.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition**. Bioresource Technology, v.74. p. 25-33, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. **Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse.** Bioresource Technology. v. 74. p. 69-80, 2000.

PARMAR, I.; RUPASINGHE, V. H. P. **Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: Enzymatic hydrolysis and fermentation.** Bioresource Technology. v. 130. p. 613-620, 2012.

PATERAKI, C.; ALMQVIST, H.; LADAKIS, D.; LIDÉN, G.; KOUTINAS, A. A.; VLYSIDIS, A. **Modelling succinic acid fermentation using a xylose based substrate.** Biochemical Engineering Journal. v.114. p. 26–41, 2016.

PITARELO, A. P. **Produção de etanol celulósico a partir do bagaço da cana pré-tratado por explosão à vapor.** Universidade Federal do Paraná. Tese de doutorado. Curitiba, PR, 2013.

POLETO, L.; SOUZA, P.; MAGRINI, F. E.; BEAL, L. L.; TORRES, A. P. R.; SOUSA, M. P.; LAURINO, J. P.; PAESI, S. **Selection and identification of microorganisms present in the treatment of wastewater and activated sludge to produce biohydrogen from glycerol.** International Journal of Hydrogen Energy. v. 41. p. 4374 - 4381, 2015

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização do pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** Universidade Estadual de Campinas, Tese de Doutorado. Campinas, São Paulo, 2010.

RABELO, S. C.; FONSECA, N. A.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A.C. **Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide.** Biomass and Bioenergy. v.35. p. 2600-2607, 2011.

RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. **Lime Pretreatment and Fermentation of Enzymatically Hydrolyzed Sugarcane Bagasse .** Appl Biochem Biotechnol. V. 169. p. 1696- 17-12. 2013.

RAMOS, L. P. **The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials.** Química Nova, v. 26. p. 863 – 871, 2003.

RAMOS, L. P.; SILVA, L.; BALLEM, A. C.; PITARELO, A. P.; CHIARELLO, L. M.; SILVEIRA, M.H. L **Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings**. *Bioresource Technology*, v. 175. P. 195-202. 2015.

RODRIGUES, T. H. S.; BRÍGIDO, J. S.; BARROS, E. M.; SILVA, W. M.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. **The Bioconversion of Pretreated Cashew Apple Bagasse into Ethanol by SHF and SSF Processes**. *Appl Biochem Biotechnol*. V. 178. p. 1167-1183, 2016.

ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, S. V.; ROTHMAN, H.. **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas, São Paulo: Editora da UNICAMP, 2005.

SÁNCHEZ, Ó. J. CARDONA, C. A. **Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks**. *Bioresource Technology*, v. 99. p. 5270–5295, 2008.

SANTOS, J. R. A.; GUSMÃO, N. B. GOUVEIA, E. R. **Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação**. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 75-80, 2010.

SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. **Yeast biotechnology: diversity and applications**. Springer, 2007.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. **Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000**. *Analytical Biochemistry*, v. 354, p. 311-313, 2006.

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. Universidade de São Paulo, Dissertação de mestrado. Lorena, SP. 2009

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; THOZOLAN, J.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. **Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot**

and industrial scales. *Bioresource Technology*. v.99. p. 8156- 8163, 2008.

TAN, I. S.; LEE, K. T. **Enzymatic hydrolysis and fermentation of seaweed solid wastes for bioethanol production: An optimization study.** *Energy*. v. 78. p. 53-62, 2014.

THUY, N. T. H.; KONGKAEW, A.; FLOOD, A.; BOONTAWAN, A. **Fermentation and crystallization of succinic acid from *Actinobacillus succinogenes* ATCC55618 using fresh cassava root as the main substrate.** *Bioresource Technology*. v.233. p. 342–352, 2017.

UNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Disponível em <http://www.unica.com.br/>. Acessado em 24 de junho de 2016.

VÁSQUEZ, M. P. **Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar.** Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tese de doutorado. Rio de Janeiro, RJ, 2007.

VIEIRA, J. G. **Síntese e caracterização da metilcelulose, a partir do bagaço de cana-de-açúcar, para utilização como aditivo na construção civil.** Universidade Federal de Uberlândia. Dissertação de mestrado. Uberlândia, MG, 2009

WHITE, T. J., T. BRUNS, S. L.; TAYLOR J. W. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** Pp. 315-322 In: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York, 1990.

ZHANG, W.; LIN, Y.; ZHANG, Q.; WANG, X.; WU, D.; KONG, H. **Optimisation of simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw for ethanol production.** *Fuel*. v. 112. p. 331-337, 2013.

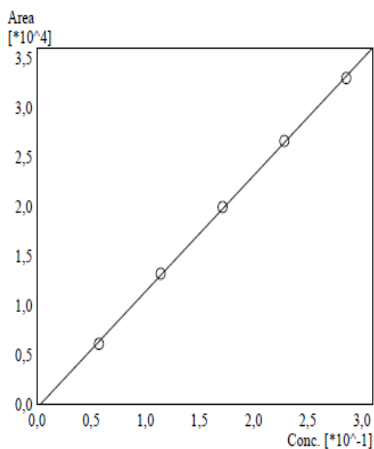
8 ANEXO A

8.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANALISADOS EM HPLC

Curva de calibração de ácido acético

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : HAc
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=117396*x-328.328$
 $Rr1=0,9998169$ $Rr2=0,9996337$ $RSS=1,649258e+005$
 $MeanRF: 1,143928e+005$ $RFSd: 3,773330e+003$ $RFRSD: 3,298572$
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : Detector A

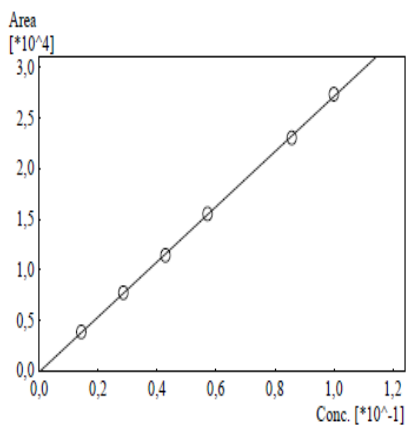


#	Conc. (Ratio)	MeanArea	Area
1	0.0571	6149	6149
2	0.1142	13227	13227
3	0.1714	19955	19955
4	0.2285	26631	26631
5	0.2857	32993	32993

Curva de Calibração de Arabinose

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : ARABINOSE
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=272692*x-122,657$
 $Rr1=0,9998505$ $Rr2=0,9997011$ $RSS=1,217738e+005$
 $MeanRF: 2,697810e+005$ $RFSD: 2,470436e+003$ $RFRSD: 0,915719$
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : Detector A

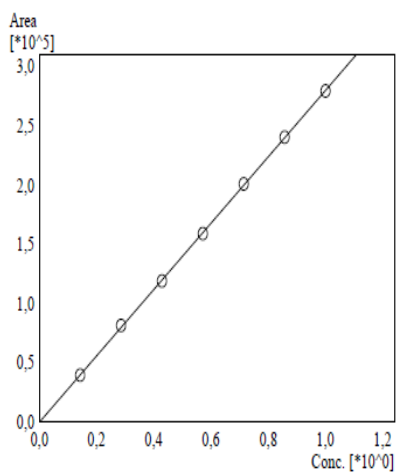


#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	0.014285	3835	3835
2	0.02857	7711	7711
3	0.04285	11423	11423
4	0.05714	15525	15525
6	0.08571	23020	23020
7	0.1	27345	27345

Curva de calibração de xilose

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : RT:9.099
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=279960*x+413.484$
 Rr1=0,9999297 Rr2=0,9998594 RSS=6,297751e+006
 MeanRF: 2,808953e+005 RFSD: 2,787648e+003 RFRSD: 0,992415
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : Detector A

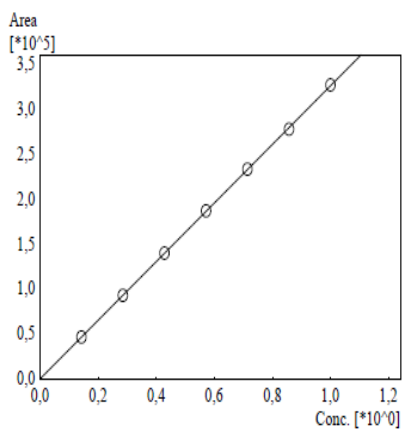


#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	0.1428	39870	39870
2	0.2857	81873	81873
3	0.4285	119468	119468
4	0.5714	159274	159274
5	0.7142	201447	201447
6	0.8571	240913	240913
7	1	279807	279807

Curva de calibração de glicose

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : Glicose
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=325965*x-318,600$
 $Rr1=0,9999646$ $Rr2=0,9999291$ $RSS=4,304075e+006$
 $MeanRF: 3,251685e+005$ $RFSD: 1,208615e+003$ $RFRSD: 0,371689$
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : Detector A

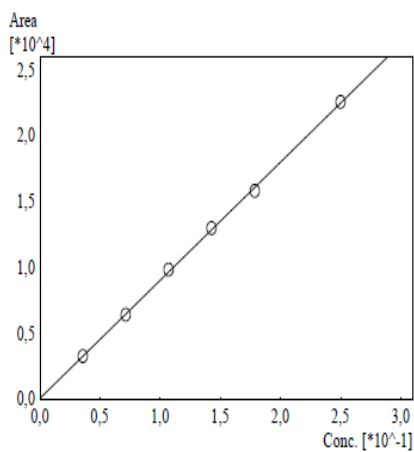


#	Conc. (Ratio)	MeanArea	Area
1	0.1428	46319	46319
2	0.2856	92501	92501
3	0.4285	139487	139487
4	0.5714	186388	186388
5	0.7142	232831	232831
6	0.8571	277354	277354
7	1	326621	326621

Curva de calibração de etanol

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : Etanol
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=89565,8*x+88,9881$
 Rr1=0,9997381 Rr2=0,9994763 RSS=1,252060e+005
 MeanRF: 9,050333e+004 RFSD: 1,186125e+003 RFRSD: 1,310587
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : Detector A

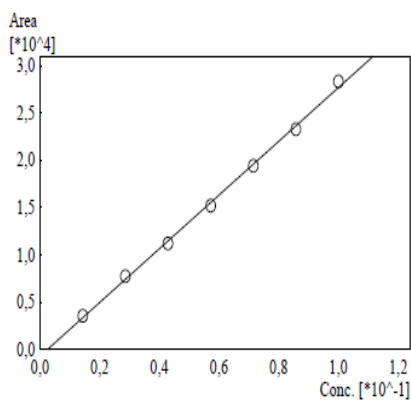


#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	0,03571	3262	3262
2	0,07142	6429	6429
3	0,1071	9838	9838
4	0,1428	12999	12999
5	0,1788	15828	15828
7	0,25	22562	22562

Curva de calibração de celobiose

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : Celobiose
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=284162*x-711.975$
 $Rr1=0,9990263$ $Rr2=0,9980535$ $RSS=8,998731e+005$
 $MeanRF: 2,674910e+005$ $RFSd: 1,091204e+004$ $RFRSD: 4,079405$
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : Detector A

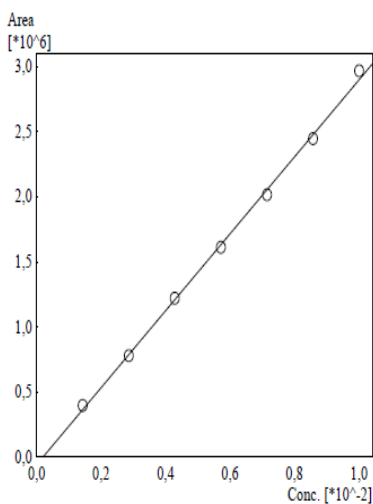


#	Conc (Ratio)	MeanArea	Area
1	0.014285	3544	3544
2	0.02857	7734	7734
3	0.04285	11193	11193
4	0.05714	15187	15187
5	0.07142	19409	19409
6	0.08571	23272	23272
7	0.1	28335	28335

Curva de calibração de furfural

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : FURFURAL
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=2,95904e+008*x-57825,1$
 Rr1=0,9991188 Rr2=0,9982383 RSS=8,829934e+009
 MeanRF: 2,829596e+008 RFSD: 7,481290e+006 RFRSD: 2,643943
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA

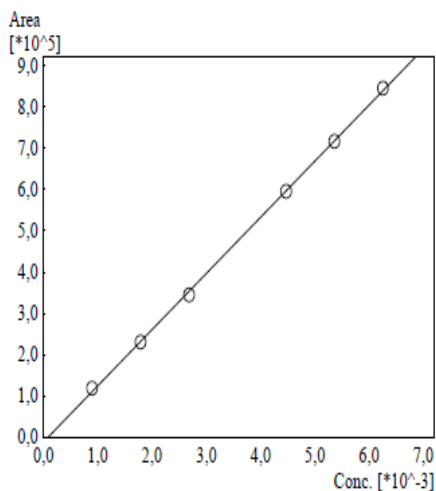


#	Conc (Ratio)	MeanArea	Area
1	0.0014285	397189	397189
2	0.0028571	777899	777899
3	0.0042857	1219834	1219834
4	0.0057142	1610862	1610862
5	0.0071428	2014043	2014043
6	0.0085714	2445057	2445057
7	0.01	2966423	2966423

Curva de calibração de hidroximetilfurfural

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : HMF
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=1,35916e+008*x-10071,5$
 Rr1=0,9997908 Rr2=0,9995817 RSS=1,725497e+008
 MeanRF: 1,323300e+008 RFSDF: 2,576294e+006 RFRSD: 1,946870
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA



#	Conc. (Ratio)	Mean-Area
1	0,00089285	119181
2	0,00178571	230841
3	0,00267857	345407
5	0,00446428	595491
6	0,00535714	716347
7	0,00625	844781