



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCOMBUSTÍVEIS



KÊNIA FRANCISCA RESENDE LAMOUNIER

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO DE BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO *GALACTOMYCES*
GEOTRICHUM* E *SACCHAROMYCES CEREVISIAE

UBERLÂNDIA
AGOSTO DE 2018

KÊNIA FRANCISCA RESENDE LAMOUNIER

**PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-
DE-AÇÚCAR UTILIZANDO *GALACTOMYCES GEOTRICHUM* E
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis *Stricto Sensu* da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, para obtenção do título de Mestre em Biocombustíveis.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Milla Alves Baffi

UBERLÂNDIA

AGOSTO DE 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L236p
2018

Lamounier, Kênia Francisca Resende, 1994-
Produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-
açúcar utilizando *Galactomyces Geotrichum* e *Saccharomyces*
Cerevisiae [recurso eletrônico] / Kênia Francisca Resende Lamounier. -
2018.

Orientador: Milla Alves Baffi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1200>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Biocombustíveis. 2. Bagaço de cana. 3. Hidrólise. 4. Álcool. I.
Baffi, Milla Alves, 1977- (Orient.) II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis. III.
Título.

CDU: 662.756

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 023/PPBIC.

DATA: 30/08/2018

DISCENTE: Kênia Francisca Resende Lamounier

MATRÍCULA: 11622PGB010

TÍTULO DO TRABALHO: "Produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando Galactomyces geotrichum e Saccharomyces cerevisiae".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Biocombustíveis

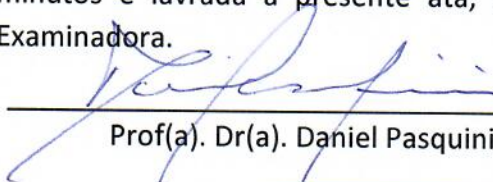
LINHA DE PESQUISA: Processos químicos e bioquímicos aplicados à conversão de biomassas a biocombustíveis.

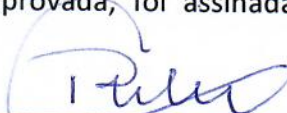
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras fermentadoras de pentoses

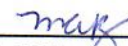
Às quatorze horas do dia trinta de agosto de dois mil e dezoito, no(a) Auditório 50-F, do bloco 50, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Daniel Pasquini, da(o) Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, e Roberto da Silva, do(a) Universidade Estadual Paulista, e Milla Alves Baffi, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPBIC. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

mantido

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 18 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof(a). Dr(a). Daniel Pasquini


Prof(a). Dr(a). Roberto da Silva


Prof(a). Dr(a). Milla Alves Baffi

Dedico este trabalho aos meus pais Adi e Dalva, a minha irmã Keli,
por todo amor, carinho, paciência, compreensão e apoio
destinados a mim durante a realização deste trabalho.

OBRIGADA POR TUDO!!!!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, a Deus, pela saúde e fé para progredir e também por me dar forças para superar todos os obstáculos durante essa etapa.

À professora Dr.^a Milla Alves Baffi por ter me orientado e compartilhado uma parcela de seu vasto conhecimento.

Ao professor Dr. Daniel Pasquini pela orientação e pelas sugestões para os problemas que tivemos no decorrer da pesquisa. Ao professor Dr. Alexandre Soares dos Santos por ceder a levedura que foi utilizada no trabalho e pelas dúvidas sanadas ao longo do projeto.

À professora Dr.^a Vicelma Luiz Cardoso pelas sugestões dadas durante a execução do trabalho e pela disponibilização do cromatógrafo para análise de açúcares e outros compostos.

Aos professores Drs. Daniel Pasquini (UFU) e Roberto da Silva (UNESP) por aceitarem o convite para compor a banca de defesa e pelas contribuições ao trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelo apoio financeiro à pesquisa.

Às técnicas Beatriz e Júlia por estarem sempre à disposição quando era preciso.

À colega de pesquisa Patrícia, por contribuir com esforços na realização da pesquisa.

Aos meus pais Dalva e Adi, por toda a dedicação e carinho ao longo desses anos, por sempre apoiarem minhas escolhas e mostrarem o caminho certo a seguir. Por sempre estarem ao meu lado durante os momentos difíceis e por acreditarem em mim.

À minha irmã Keli, meu exemplo de vida a seguir, por ser a pessoa que me introduziu desde a minha infância à pesquisa científica, por ter ido comigo incontáveis vezes ao laboratório durante os fins de semana e feriados. Por ter tido paciência, tirar minhas dúvidas, me apoiado e incentivado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“O aumento do conhecimento é como uma esfera dilatando-se no espaço:
quanto maior a nossa compreensão, maior o nosso contato com o desconhecido.”*

Blaise Pascal

RESUMO

A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado tem sido alvo de pesquisas no Brasil e no mundo, sendo, o bagaço de cana-de-açúcar (BC) um dos subprodutos mais estudados. Nesse contexto, o presente trabalho investigou o pré-tratamento alcalino de BC, seguido de sacarificação com enzima comercial Cellic Ctec3 (em condições variáveis de tempo e porcentagem de BC). Os hidrolisados foram submetidos à fermentação utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (fermento comercial) e *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R150 na produção de etanol de segunda geração (etanol 2G). O pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH 2%) foi eficiente na remoção de lignina, ocorrendo uma redução de 58,15% no bagaço tratado (BT). Foi observado também que a fração celulósica se conservou e também houve um aumento da porosidade nas fibras em BT. Em relação às hemiceluloses, houve uma remoção de 31,66% em BT. Após as sacarificações, foram quantificadas as concentrações de açúcares redutores totais (ART) pelo método colorimétrico, utilizando ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) e de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As concentrações máximas de ART (73,96 g.L⁻¹) e de D-glicose e D-xilose (31,78 e 10,85 g.L⁻¹, respectivamente) foram obtidas no hidrolisado contendo 10% de BT após 72 horas de hidrólise. Em seguida, foram realizadas fermentações alcoólicas, nas quais a viabilidade celular (VC) e a produção de etanol foram avaliadas. Os melhores resultados também foram obtidos após as fermentações utilizando o hidrolisado com 10% de BT (72 horas): *G. geotrichum* UFVJM-R150 com pico de VC de $1,23 \times 10^{10}$ células.mL⁻¹ e produção máxima de 9,99 g.L⁻¹ de etanol (produtividade volumétrica - Q_P de 0,42 g.L⁻¹.h⁻¹ e rendimento em etanol em função do substrato - $Y_{P/S}$ de 0,27 g_{etanol}.g_{açúcar}⁻¹) e *S. cerevisiae* com $7,76 \times 10^9$ células.mL⁻¹ e 16,15 g.L⁻¹ de etanol (Q_P de 0,67 g.L⁻¹.h⁻¹ e $Y_{P/S}$ de 0,48 g_{etanol}.g_{açúcar}⁻¹). Observou-se ainda que, além de etanol, *G. geotrichum* produziu outros produtos de valor agregado tais como o ácido galacturônico, o ácido propiônico e o álcool isoamílico. Esses compostos foram produzidos em diferentes concentrações nas fermentações utilizando hidrolisado de 10% de BT (72 horas), YPX e solução modelo. A produção de tais metabólitos secundários contribui para a aplicação de *G. geotrichum* UFVJM-R150 em biorrefinarias. Os valores de rendimento, produtividade em etanol e consumo de D-glicose e D-xilose por *G. geotrichum* UFVJM-R150 foram bastante satisfatórios. Este é o primeiro estudo que descreve a produção de etanol 2G e outros subprodutos por *G. geotrichum* UFVJM-R150 a partir de hidrolisados de BT.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar; pré-tratamento alcalino; hidrólise enzimática; etanol 2G; *Galactomyces geotrichum*; *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

The use of agroindustrial residues for the production of biofuels and other value-added products has been the subject of research in Brazil and in the world, being the sugarcane bagasse (SCB) one of the most studied by-products. In this context, the present work investigated the alkaline pre-treatment of SCB, followed by saccharification using commercial enzyme Cellic Ctec3 (under variable conditions of time and percentage of bagasse) and the alcoholic fermentation with commercial *Saccharomyces cerevisiae* and *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R150 yeasts in the production of second generation ethanol (2G ethanol). The pre-treatment of the SCB with sodium hydroxide (NaOH 2%) was efficient for the removal of lignin, with a reduction of 58.15% in pre-treated bagasse (PTB). It was also observed that the cellulosic fraction was conserved and there was an increase of the porosity in the fibers in PTB. Concerning hemicelluloses, there was a removal of 31.66% in PTB. After saccharification, the concentrations of total reducing sugars (TRS) by the colorimetric method were quantified using 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) and the monosaccharides by high performance liquid chromatography (HPLC). The highest concentrations of TRS (73.96 g.L⁻¹), and D-glucose and D-xylose (31.78 and 10.85 g.L⁻¹, respectively) were obtained in the hydrolysate containing 10% PTB after 72 hours of hydrolysis. Then, alcoholic fermentations were performed, in which cell viability (CV) and ethanol production were evaluated. The greatest results were also obtained after the fermentations using the hydrolysate with 10% PTB (72 hours): *G. geotrichum* UFVJM-R150 with a peak of CV of 1.23x10¹⁰ cells.mL⁻¹ and maximum ethanol production of 9.99 g.L⁻¹ (volumetric productivity - Q_P de 0,42 g.L⁻¹.h⁻¹ yield of ethanol as a function of the substrate - Y_{P/S} of 0.27 g_{ethanol}.g_{sugar}⁻¹) and *S. cerevisiae* with 7.76x 10⁹ cells.mL⁻¹ and 16.15 g.L⁻¹ of ethanol (Q_P of 0.67 g.L⁻¹.h⁻¹ and Y_{P/S} of 0.48 g_{ethanol}.g_{sugar}⁻¹). It was observed that, besides ethanol *G. geotrichum* UFVJM-R150 was able to produce other value-added products, such as galacturonic acid, propionic acid, isoamyl alcohol. These compounds were produced in different concentrations in the fermentations of hydrolysates 10% PTB (72 hours), YPX and model solution. The production of these secondary metabolites may enable the application of *G. geotrichum* UFVJM-R150 in biorefineries. In addition, the values of yield and productivity in ethanol and the consumption of D-glucose and D-xylose by *G. geotrichum* UFVJM-R150 were quite satisfactory. This is the first study which reports the 2G ethanol production and other byproducts by *G. geotrichum* UFVJM-R150 from PTB hydrolysates.

Key words: sugarcane bagasse; enzymatic hydrolysis; 2G ethanol; *Galactomyces geotrichum*; *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 - Representação da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.</i>	14
<i>Figura 2-Exemplos de alguns produtos gerados a partir da biomassa.</i>	17
<i>Figura 3- Estrutura da lignocelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar.</i>	18
<i>Figura 4 - Representação de uma molécula de celulose.</i>	19
<i>Figura 5 - Ligações de hidrogênio inter e intramoleculares da celulose.</i>	20
<i>Figura 6 – Exemplos de unidades monoméricas que compõem as hemiceluloses.</i>	21
<i>Figura 7 - Estrutura química da xilana com cadeias laterais.</i>	22
<i>Figura 8 - Esquema da estrutura química da lignina.</i>	23
<i>Figura 9 - Estrutura dos álcoois precursores da lignina: a) álcool p-cumarílico, b) álcool coniférico, c) álcool sinapílico.</i>	24
<i>Figura 10 - Representação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.</i>	25
<i>Figura 11 – Metabolismo de D-xilose e D-glicose em leveduras fermentadoras de D-xilose e D-glicose.</i>	32
<i>Figura 12 - Esquema mostrando as estruturas de uma levedura típica.</i>	33
<i>Figura 13 – Aspecto macroscópico da linhagem Galactomyces geotrichum (UFVJM-R150) cultivada no meio YEPM por 48 horas, mostrando a forma circular, coloração branca, aspecto filamentosos e estrias concêntricas (a e b). Microrganismos com hifas verdadeiras septadas com desarticulação em artroconídeos cilíndricos (c e d).</i>	35
<i>Figura 14 - Desenho esquemático da Câmara de Neubauer evidenciando a área de contagem.</i>	48
<i>Figura 15 – Imagem mostrando as células viáveis (incolores) e não viáveis (azuis) da levedura Saccharomyces cerevisiae .</i>	48
<i>Figura 16 - Viabilidade celular de G. geotrichum UFVJM-R150, durante a fermentação com diferentes substratos.</i>	56
<i>Figura 17 - Viabilidade celular de S. cerevisiae, durante a fermentação com hidrolisados a 3 (24 horas) e 10% (72 horas).</i>	57
<i>Figura 18 - Otimização do pré-inóculo para G. geotrichum UFVJM-R150 com hidrolisados suplementados.</i>	58
<i>Figura 19 - Otimização do pré-inóculo para S. cerevisiae com hidrolisados suplementados.</i>	58
<i>Figura 20 - Representação esquemática das moléculas de a) ácido galacturônico, b) ácido propiônico, c) álcool isoamílico.</i>	61

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Composição química do bagaço bruto (BB), bagaço tratado (BT) e bagaço tratado corrigido pelo rendimento (BT_R).</i>	51
<i>Tabela 2 - Concentrações de ART, D-glicose e pentoses nos hidrolisados.</i>	53
<i>Tabela 3 - Componentes encontrados nos hidrolisados após análise por CLAE.</i>	54
<i>Tabela 4 - Compostos encontrados após fermentações empregando <i>S. cerevisiae</i>.</i>	59
<i>Tabela 5 - Compostos encontrados após fermentações empregando <i>G. geotrichum</i> UFVJM-R150.</i>	60
<i>Tabela 6 - Taxas de rendimento em etanol e produtividade volumétrica.</i>	62
<i>Tabela 7 – Concentração (g.L⁻¹) e consumo de açúcares (%) antes e após a fermentação alcoólica utilizando <i>G. geotrichum</i> UFVJM-R150.</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ART – Açúcares redutores totais;
- ATP – Adenosina trifosfato;
- BB - Bagaço bruto;
- BC – Bagaço de cana-de-açúcar;
- BT - Bagaço tratado;
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência;
- DNS – Ácido 3,5 dinitrosalicílico;
- DO – Densidade óptica
- Etanol 1G – Etanol de primeira geração;
- Etanol 2G – Etanol de segunda geração;
- GOD-POD - Glucose oxidase (GOD) e peroxidase (POD);
- PA – Ácido propiônico;
- PTA – Pré-tratamento alcalino;
- Q_p – Produtividade volumétrica;
- VC – Viabilidade celular;
- XD – Xilitol desidrogenase;
- XR – Xilose redutase;
- XQ – Xilulose quinase;
- $Y_{P/S}$ – Rendimento de etanol em função do substrato;
- YPD – Yeast peptone dextrose (extrato de levedura, peptona e D-glicose);
- YPX - Yeast peptone xylose (extrato de levedura, peptona e D-xilose);

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1.	<i>Etanol de 2ª geração</i>	16
2.2.	<i>Bagaço de cana-de-açúcar</i>	18
2.2.1.	<i>Celulose</i>	19
2.2.2.	<i>Hemiceluloses</i>	20
2.2.3.	<i>Lignina</i>	22
2.2.4.	<i>Pré-tratamentos de resíduos lignocelulósicos</i>	24
2.2.4.1.	<i>Pré-tratamentos alcalinos</i>	26
2.3.	<i>Hidrólise</i>	26
2.3.1.	<i>Hidrólise enzimática</i>	27
2.3.2.	<i>Inibidores da hidrólise enzimática</i>	28
2.4.	<i>Fermentação alcoólica</i>	29
2.4.1.	<i>Inibidores da fermentação alcoólica</i>	29
2.4.2.	<i>Fermentação de hexoses (C6) e pentoses (C5)</i>	31
2.4.2.1.	<i>Leveduras fermentadoras de C5</i>	33
2.4.2.1.1.	<i>Galactomyces geotrichum</i>	34
3.	OBJETIVOS	37
3.1.	<i>Objetivos específicos</i>	37
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1.	<i>Bagaço de cana-de-açúcar</i>	38
4.2.	<i>Pré-tratamento alcalino (PTA)</i>	38
4.3.	<i>Caracterização química do bagaço bruto (BB) e pré-tratado (BT)</i>	38
4.3.1.	<i>Teor de umidade</i>	38
4.3.2.	<i>Teor de cinzas</i>	39
4.3.3.	<i>Determinação do teor de lignina Klason insolúvel</i>	39
4.3.4.	<i>Determinação do teor de lignina Klason solúvel</i>	40
4.3.5.	<i>Determinação do teor de holocelulose</i>	42
4.3.6.	<i>Teor de celulose</i>	43

4.3.7.	<i>Teor de hemiceluloses</i>	43
4.4.	<i>Dosagem de celulases totais (FPase)</i>	44
4.5.	<i>Hidrólise enzimática</i>	44
4.5.1.	<i>Quantificação de açúcares redutores totais (ART)</i>	44
4.5.2.	<i>Determinação da concentração de D-glicose livre (GOD-POD)</i>	45
4.5.3.	<i>Determinação dos teores de pentoses</i>	45
4.5.4.	<i>Determinação das concentrações de açúcares e inibidores por CLAE</i>	46
4.6.	<i>Fermentação alcoólica do hidrolisado</i>	46
4.6.1.	<i>Manutenção de <i>G. geotrichum</i> UFVJM-R150</i>	47
4.6.2.	<i>Preparo do pré-inóculo</i>	47
4.6.3.	<i>Monitoramento do processo fermentativo</i>	47
4.6.3.1.	<i>Viabilidade celular</i>	48
4.6.3.3.	<i>Quantificação da concentração de etanol por CLAE</i>	49
4.6.3.4.	<i>Determinação dos parâmetros da fermentação</i>	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
5.1.	<i>Caracterização química do bagaço bruto (BB) e pré-tratado (BT)</i>	51
5.2.	<i>Quantificação de açúcares nos hidrolisados por ART e GOD-POD</i>	53
5.3.	<i>Quantificação de açúcares presentes no hidrolisado por CLAE</i>	54
5.4.	<i>Fermentação alcóolica</i>	56
5.4.1.	<i>Viabilidade celular</i>	56
5.4.2.	<i>Produção de etanol e outros compostos</i>	59
6.	CONCLUSÕES	64
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

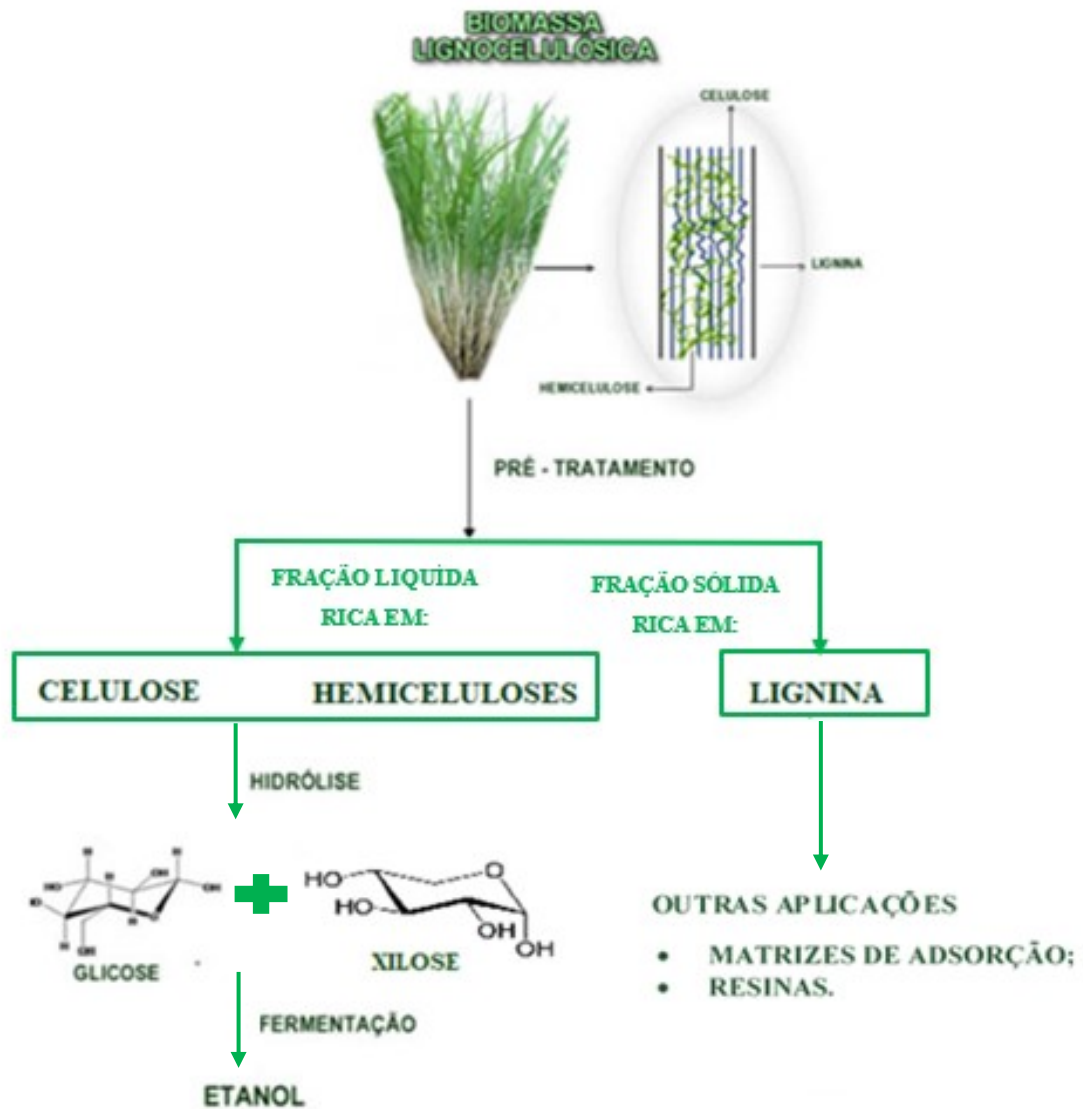
As mudanças climáticas, o aumento da população mundial, o uso indiscriminado de combustíveis fósseis e a instabilidade no mercado do petróleo têm contribuído para o crescente desafio de tornar o suprimento de energia sustentável (HAHN-HÄGERDAL et. al., 2006). Essas questões têm motivado a busca por combustíveis alternativos a partir de fontes renováveis (biocombustíveis). Entre os biocombustíveis, o bioetanol (etanol de segunda geração ou etanol 2G) é um dos mais promissores por possuir potencial de substituir a gasolina e pelo fato de o Brasil se encontrar em uma posição de destaque na produção de cana-de-açúcar (WYMAN, 1999; PETROU; PAPPIS, 2009). Além disso, sua utilização pode contribuir para a redução de problemas ambientais, tais como o desmatamento florestal, o emprego de novas áreas de plantio e a redução do lançamento de resíduos no ambiente.

Diversas indústrias produzem toneladas de resíduos lignocelulósicos, como por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar (BC). Alguns resíduos podem ser convertidos a subprodutos enquanto outros são descartados como lixo (ALVIM et. al., 2014; VALINHAS, 2016). A própria indústria de etanol da cana-de-açúcar gera grandes quantidades dessas biomassas que podem ser convertidas em etanol 2G ou serem utilizadas na queima em caldeiras para a produção de energia elétrica (ROVIERO et. al., 2015; VALINHAS, 2016).

Os principais componentes da biomassa lignocelulósica são a celulose, as hemiceluloses e a lignina. A celulose é um homopolissacarídeo linear com fórmula molecular $(C_6H_{12}O_6)_n$, constituído de 7.000 a 15.000 unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (BRETHAUER; STUDER, 2015; MARQUES, 2017). Hemiceluloses heteropolímeros ricos em pentoses (C5) que apresentam como principal componente a xilana, cuja hidrólise gera D-xilose de forma predominante, sendo considerado o segundo monossacarídeo mais abundante na natureza (MATSUSHIKA et. al., 2009; MATOS et. al., 2014; VALINHAS, 2016). A lignina é uma macromolécula amorfa, formada por diferentes unidades de fenilpropano unidas por ligações éter, que confere impermeabilidade e resistência ao ataque microbiano e ao estresse oxidativo às plantas (GUPTA et. al., 2016; DIAS, 2017).

As biomassas lignocelulósicas geralmente apresentam uma estrutura complexa e compacta, sendo necessário realizar a despolimerização das fibras e liberação de açúcares na forma de monossacarídeos para a obtenção de etanol 2G através de três etapas (Figura 1): i) pré-tratamentos (físicos, químicos ou biológicos ou a combinação destes), ii) hidrólises (sacarificações) enzimáticas ou químicas e, por último, iii) fermentação alcoólica (RABELO, 2010; KARP et. al., 2013; RODRIGUES, 2016).

Figura 1 - Representação da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de DOS SANTOS et. al., (2012).

O pré-tratamento é necessário para remover a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade da estrutura das fibras, de maneira a tornar a biomassa susceptível à sacarificação (TOQUERO; BOLADO, 2014; CHEN; FU, 2016; VALINHAS, 2016). Dessa forma, o pré-tratamento pode facilitar o ataque de enzimas à biomassa durante a hidrólise e diminuir a quantidade de extratos enzimáticos (PANDEY et. al., 2000). A amostra resultante do pré-tratamento e da hidrólise contém quantidades variáveis de monossacarídeos, sendo estes, pentoses (C5) e hexoses (C6) que podem ser convertidos a etanol (VALINHAS, 2016).

Atualmente, *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura comumente empregada na fermentação de hexoses a etanol (VALINHAS, 2016). No entanto, esta levedura não possui

habilidade para fermentar C5, sendo necessária a busca por linhagens capazes de fermentar pentoses para que haja um melhor aproveitamento da biomassa e maiores rendimentos em etanol sejam alcançados (KURTZMAN et. al., 2010; BRITO, 2016). A espécie *Galactomyces geotrichum* é uma levedura fermentativa descrita recentemente como fermentadora tanto de C6 quanto de C5 (VALINHAS, 2016). No entanto, até o momento não foram encontrados, na literatura, estudos que descrevam a sua utilização na produção de etanol por fermentação de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, sendo empregada somente em meios sintéticos ou suplementados (VALINHAS, 2016; BARBOSA, 2017) e na torta de girassol (MATOS et. al., 2018).

Nesse sentido, no presente trabalho, hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BT) com hidróxido de sódio (NaOH) foram submetidos à fermentação alcoólica utilizando as leveduras *S. cerevisiae* e *G. geotrichum*, com o objetivo de comparar o desempenho de *G. geotrichum* em relação à *S. cerevisiae*, na produção de etanol 2G.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Etanol de 2ª geração

O etanol combustível apresenta relevância mundial no setor socioeconômico e ambiental (ROVIERO et. al., 2015; CARIOCA, 2010; VALINHAS, 2016). Atualmente, o Brasil é o segundo produtor mundial de etanol produzindo por volta de 27,76 bilhões de litros por ano na safra 2017/2018 (CONAB, 2018).

No Brasil, o etanol de primeira geração (etanol 1G) surgiu com o Proálcool nos anos 70, obtido a partir da sacarose do caldo de cana-de-açúcar (COSTA NETO et. al., 2000). Mas o etanol 1G compete com o setor alimentício na produção de açúcar, o que gera discussão em torno do tema, além de gerar grandes volumes residuais de bagaço de cana-de-açúcar (COSTA NETO et. al., 2000). O etanol produzido a partir do bagaço (BC) (etanol de segunda geração ou etanol 2G) é vantajoso, pois, além de substituir fontes fósseis de energia e contribuir para a redução da emissão de gases de efeito estufa, não compete diretamente com a produção de alimentos (SERNA et. al., 2016; NEGAHDAR et. al., 2016; ZHUANG et. al., 2016; BRITO, 2016). Portanto, uma alternativa para aumentar a produção de etanol sem expandir a área de plantio é empregar os resíduos lignocelulósicos como, por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar (PANDEY, 2015; YU et. al., 2015; VALINHAS, 2016).

A biomassa lignocelulósica é composta por celulose (polissacarídeo constituído por unidades de D-glicose ligadas por ligações β -1,4 com uma estrutura cristalina), envolvida por hemiceluloses (polímeros compostos por diferentes frações de unidades de D-glicose, galactose, manose, D-xilose e arabinose em forma amorfa) e lignina para fornecer proteção contra a degradação química e biológica (HORN et. al., 2012; DOS SANTOS et. al., 2016). A composição dos componentes primários varia de 40-50% de celulose, 20-40% de hemiceluloses, 20-30% de lignina e 5-8% de extrativos, incluindo proteínas, lipídios, pectina e minerais (DOS SANTOS et. al., 2016).

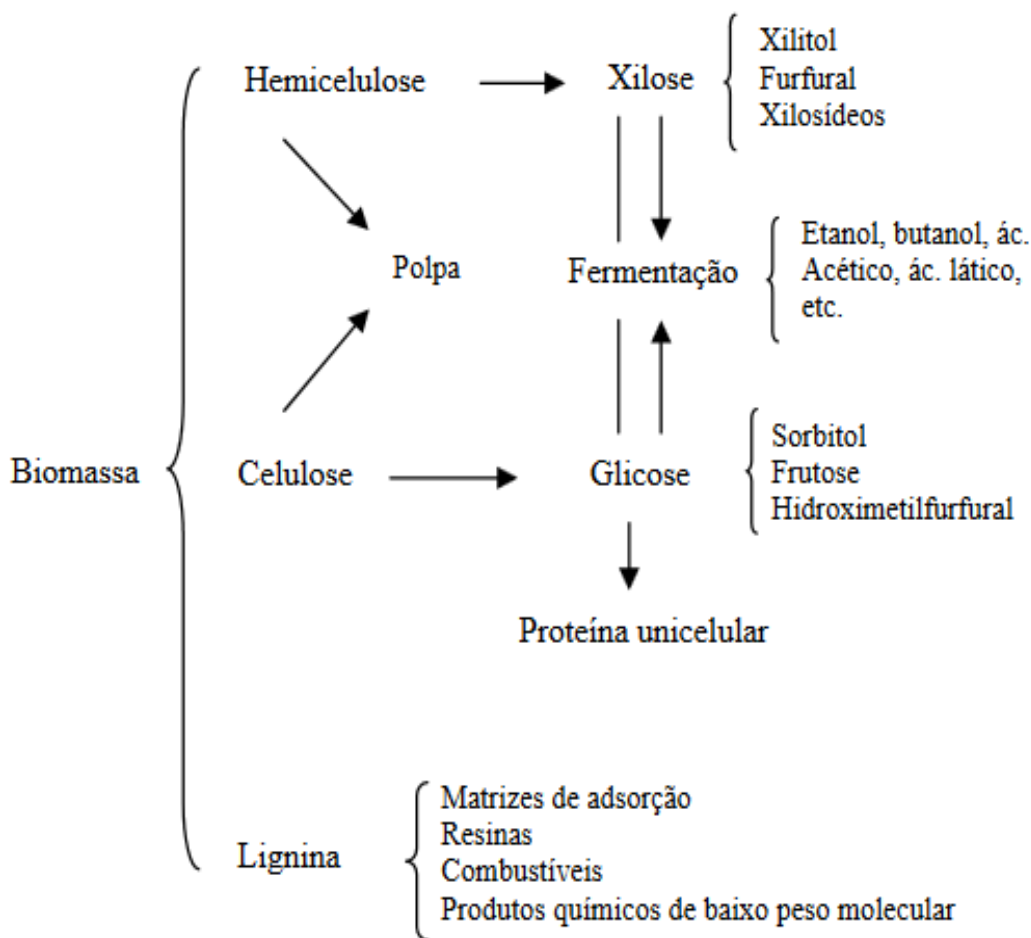
Resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substratos em processos fermentativos, pois possuem cerca de 70% da matéria seca constituída pelos carboidratos celulose e hemiceluloses (TAMANINI; HAULY, 2004). No segmento de subprodutos, BC representa a maior porcentagem de subprodutos da agroindústria brasileira, com uma média de 75 milhões de toneladas por ano (TEIXEIRA et. al., 2007; VALINHAS, 2016).

Neste sentido, BC pode ser reaproveitado como substrato para crescimento de microrganismos e produção de enzimas, utilizadas em hidrólises de biomassa lignocelulósica

para a produção de etanol 2G (SILVA, 2014). Sua utilização ainda pode contribuir para a diminuição de problemas ambientais, principalmente para não aumentar a área de plantio (COSTA NETO et. al., 2000) e o excedente ainda pode ser queimado para a produção de energia elétrica (DOS SANTOS et. al., 2016).

No entanto, a forte interação entre a celulose, hemiceluloses e lignina limita o seu aproveitamento e constitui o principal desafio para a sua conversão em carboidratos fermentescíveis (MAZA et. al., 2014). Para a produção de etanol a partir de BC, três etapas são necessárias: i) pré-tratamento, ii) hidrólise e iii) fermentação alcoólica. Além de etanol 2G, dentro do contexto de biorrefinaria, diversos bioprodutos podem ser obtidos a partir do reaproveitamento de biomassas lignocelulósicas, tais como xilitol, butanol, resinas e outros (Figura 2).

Figura 2—Exemplos de alguns produtos gerados a partir da biomassa.



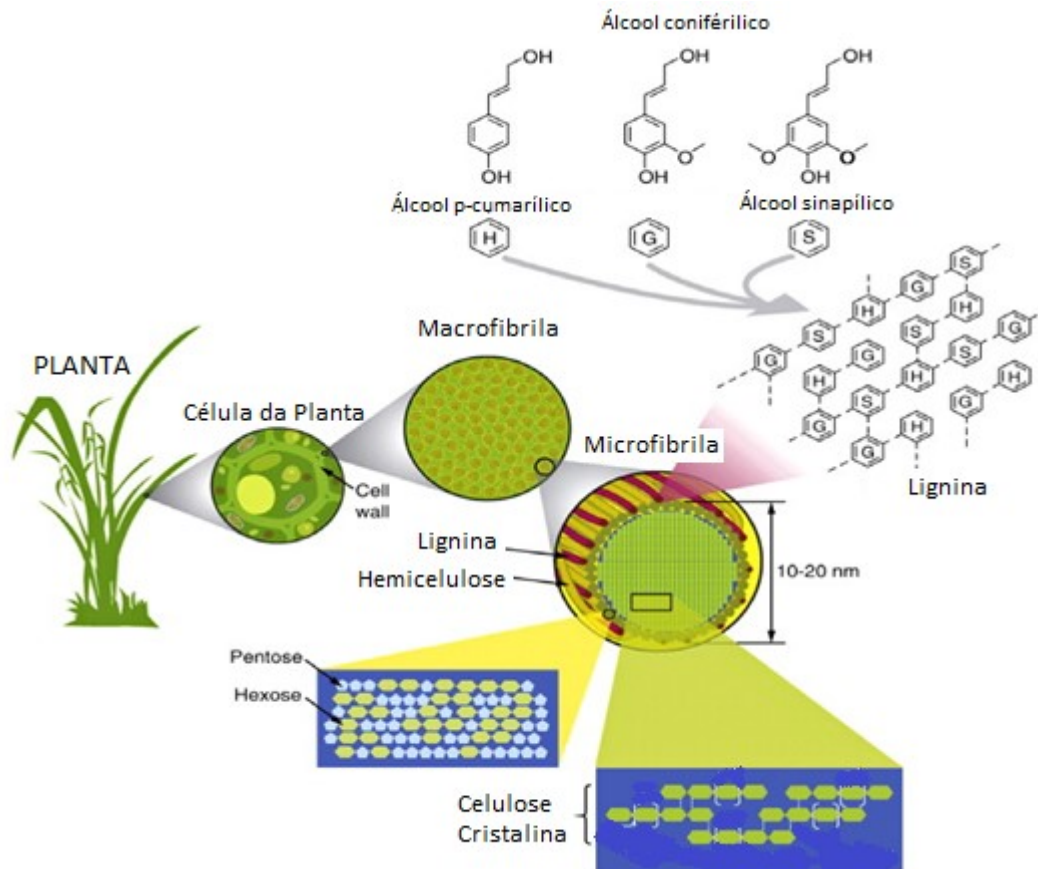
Fonte: GARCIA (2009).

2.2. Bagaço de cana-de-açúcar

Posteriormente à moagem da cana, em um procedimento que ocorre nos ternos das moendas das usinas de açúcar e etanol, é obtido um resíduo em abundância, o bagaço de cana-de-açúcar (BC). O bagaço atualmente é queimado para a produção de energia elétrica ou térmica (DOS SANTOS et. al., 2016). Uma tonelada métrica de cana produz aproximadamente 250 kg de BC (50% de umidade). Toda essa biomassa tem um enorme potencial para gerar eletricidade ou etanol por tecnologias de segunda geração (DOS SANTOS et. al., 2016).

O bagaço de cana-de-açúcar é composto principalmente por 20-30% de lignina, 40-45% de celulose e 30-35% hemiceluloses (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016), além de outros componentes em menor quantidade, sendo que celulose e hemiceluloses representam uma fonte potencial de açúcares fermentescíveis (MEDINA, 2013; SILVA, 2015). Porém, a forte interação entre esses polissacarídeos com a lignina limita a sua utilização e constitui o principal desafio para a sua conversão em monossacarídeos (MAZA et. al., 2014).

Figura 3- Estrutura da lignocelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar.

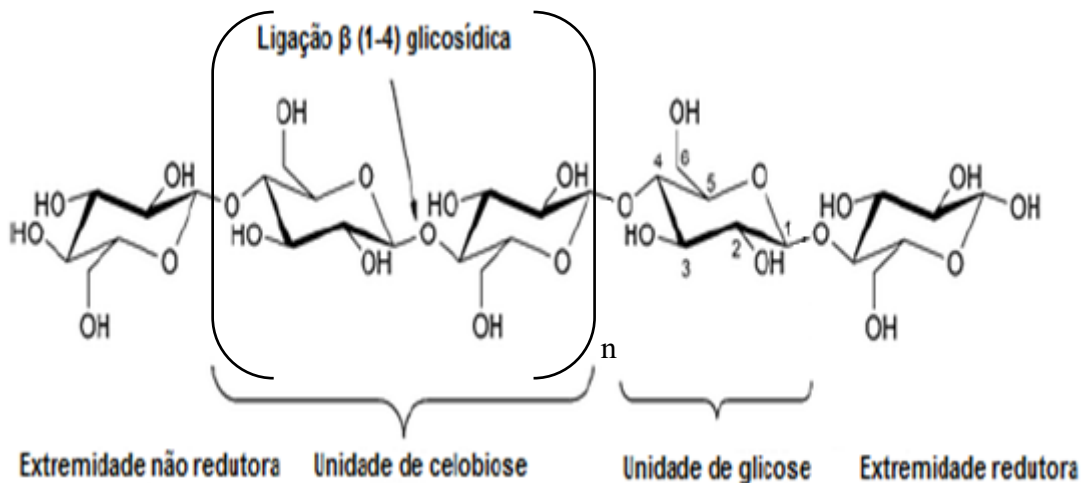


Fonte: MENG; RAGAUSKAS (2014).

2.2.1. Celulose

A celulose, principal componente da parede celular vegetal, constitui-se no composto orgânico mais frequentemente encontrado na natureza (SOUZA; SANTOS, 2002; CHANDRA et. al., 2012; RODRIGUES, 2016), correspondendo a cerca de 40% do peso seco das plantas (PALMA-FERNANDEZ, 2002; LELLIS, 2012). É um homopolímero linear com fórmula molecular $(C_6H_{12}O_6)_n$, constituído de 7.000-15.000 unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (BRETHAUER; STUDER, 2015; MARQUES, 2017). As unidades de D-glicose combinam-se para formar um dissacarídeo conhecido como celobiose, que é a unidade repetitiva fundamental da celulose (Figura 4). Cada molécula relaciona-se com a seguinte por um ângulo de 180° através da ligação $\beta(1\rightarrow4)$ e por pontes de hidrogênio entre o oxigênio do anel e o grupamento hidroxila na posição 3 da molécula seguinte e entre as hidroxilas das posições 2 e 6 (Figura 5), conformação que permite a formação de longas cadeias lineares (STRYER et. al., 2002; NELSON; COX, 2004).

Figura 4 - Representação de uma molécula de celulose.

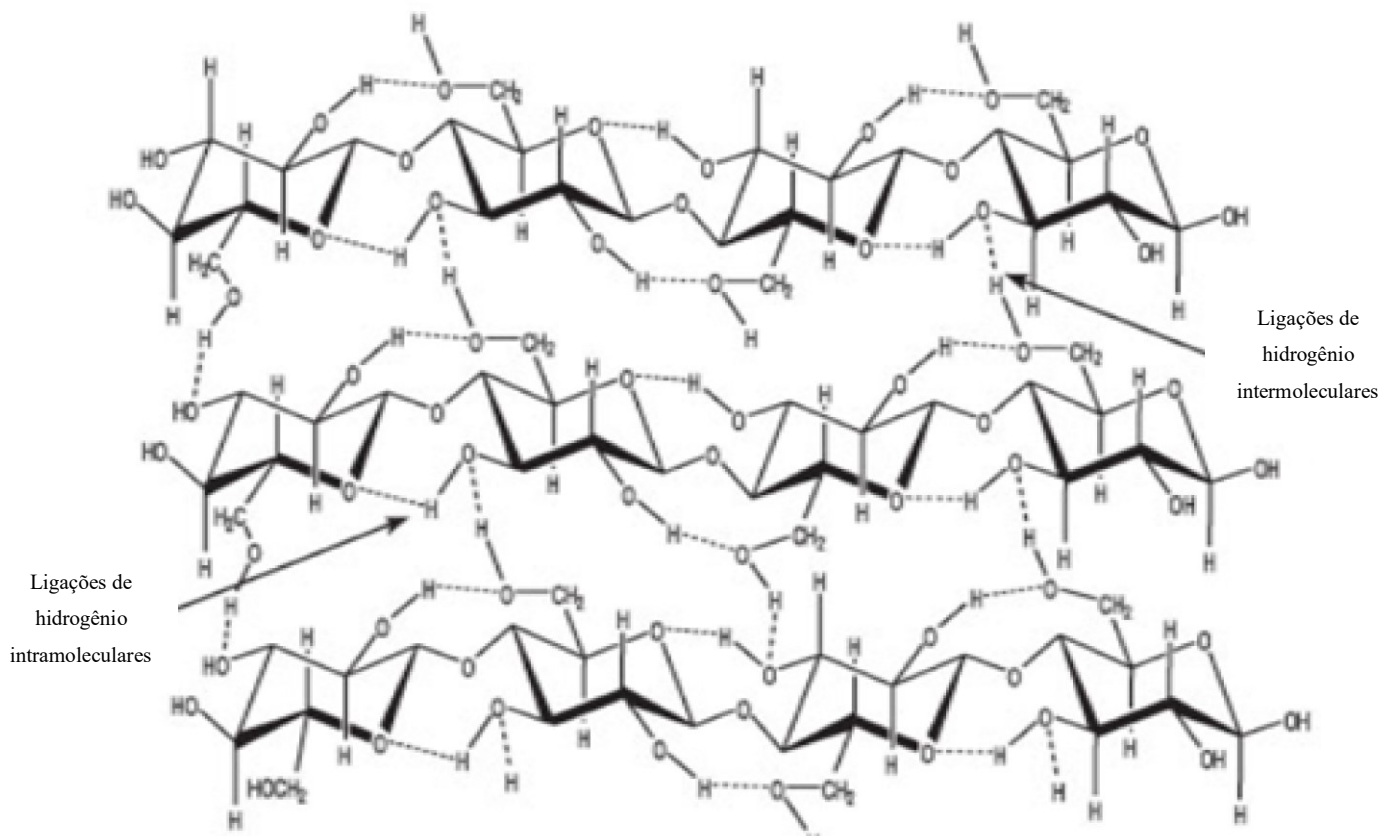


Fonte: MARQUES (2017).

De uma forma mais detalhada, as cadeias de celulose são mantidas por inúmeras ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (Figura 5) que são responsáveis pela formação de microfibrilas rígidas e insolúveis (PEREIRA, 2013). As fibras de celulose são divididas em regiões cristalinas e regiões amorfas. As regiões cristalinas são formadas por uma configuração

paralela das cadeias lineares, tornando-a mais resistente à hidrólise (BOBBIO; BOBBIO, 2003; NELSON; COX, 2004).

Figura 5 - Ligações de hidrogênio inter e intramoleculares da celulose.



Fonte: Adaptado de DOS SANTOS et. al., (2012).

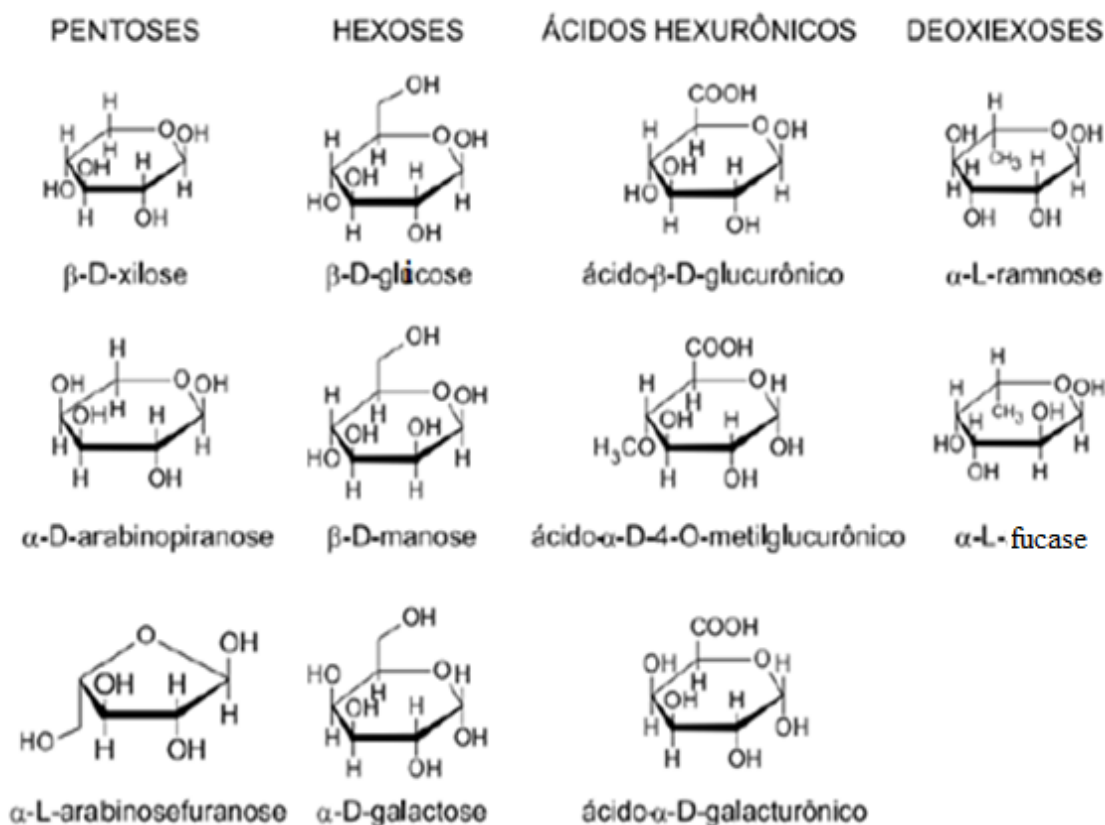
2.2.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses apresentam composições e estruturas heterogêneas, dependendo da sua fonte e forma de extração (SHAHZADI et. al., 2014; AGBOR et. al., 2011; HARMSSEN et. al., 2010; VALINHAS, 2016). Contrariamente à celulose, que possui regiões cristalinas e amorfas, as hemiceluloses são constituídas somente por regiões amorfas (SANTOS et. al., 2012; RODRIGUES, 2016), sendo que uma de suas funções é interligar as fibrilas de celulose à lignina, envolvendo, assim, a celulose com a lignina, formando uma barreira física natural contra ataques enzimáticos (PHILIPPINI, 2012; RODRIGUES, 2016).

As hemiceluloses são heteropolímeros com vários graus de ramificações, compostas por diferentes açúcares, tais como: pentoses (β -D-xilose; α -L-arabinose, etc.), hexoses (β -D-manose; β -D-glicose; α -D-galactose), ácidos (α -D-4-O-metilglucurônico; α -D-galacturônico) e

deoxiexoses (α -L-ramnose, α -L-fucose) (Figura 6) (BALAT et. al., 2008; MORAIS et. al., 2010, RODRIGUES, 2016).

Figura 6 – Exemplos de unidades monoméricas que compõem as hemiceluloses.



Fonte: RODRIGUES (2016).

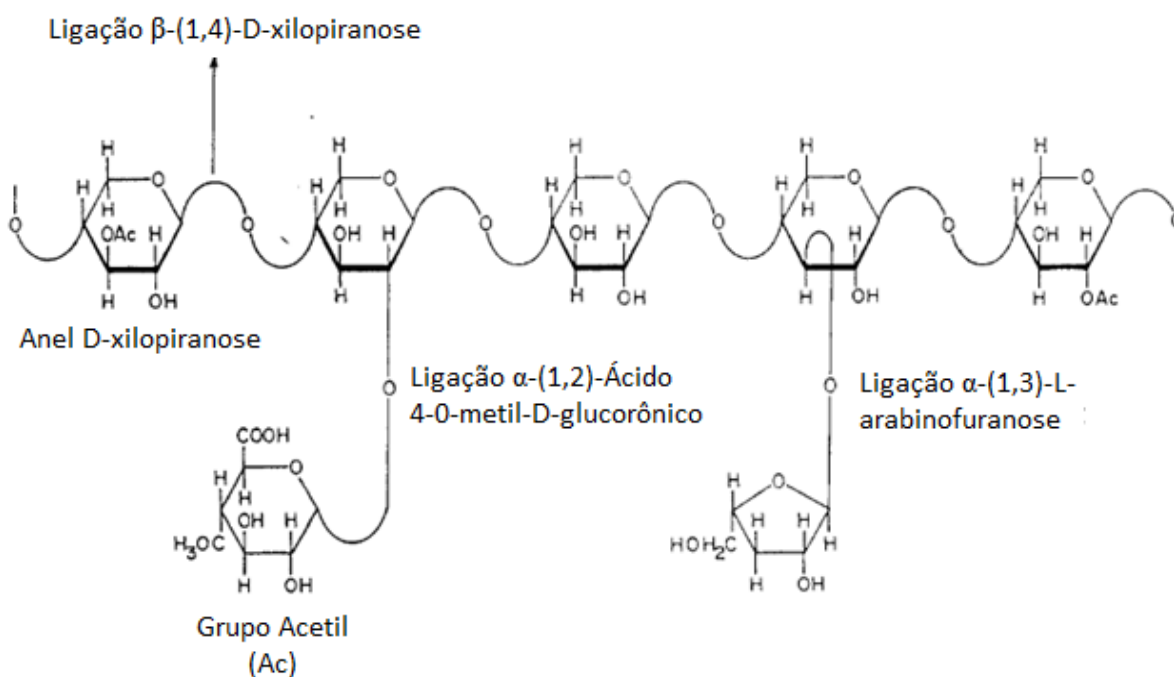
Na natureza, as hemiceluloses são estruturas complexas compostas por diferentes tipos de açúcares, constituindo diferentes polímeros, sendo os mais comuns as glucuranoxilanas, glucuronoarabinoxilanas, glucomananas e galactoglucomananas (DOS SANTOS et. al., 2016). Normalmente, as hemiceluloses são classificadas de acordo com o resíduo (xilanas, mananas e glucanas) (WYMAN et. al., 2005; PHILIPPINI, 2012). Essa diversidade de carboidratos presente nas hemiceluloses possibilita uma maior variedade de arranjos estruturais, sendo encontradas diversas subclasses de hemiceluloses, dependendo da espécie vegetal, do estágio de desenvolvimento e do tipo de tecido (GÍRIO et. al., 2010; PHILIPPINI, 2012).

As hemiceluloses estão geralmente disponíveis em grandes quantidades como subprodutos florestais, agroindustriais e de indústrias de madeira e papel, constituindo entre 20-30% da biomassa vegetal (MACHADO, 2013). Em alguns tecidos de gramíneas e cereais, são encontradas em até 50% da biomassa (EBRINGÉVORÁ et. al., 2005; GÍRIO et. al., 2010;

MACHADO, 2013). As hemiceluloses geralmente constituem cerca de 19-24% em BC (SANTOS et. al., 2012; RODRIGUES, 2016), sendo a xilana o tipo mais predominante (BEG et. al., 2001; COLLINS et. al., 2005; KATAPODIS et. al., 2006).

A xilana é constituída predominantemente por monômeros de D-xilose, sendo que o seu aproveitamento eficiente também é imprescindível para processos de bioconversão, tanto para a fermentação alcoólica como para a indústria de alimentos (Figura 7) (DA-SILVA, 1992; SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2013; VALINHAS, 2016). Além da xilana, arabinoxilanos e os β -glucanos são também encontradas em maiores proporções e os xiloglucanos em baixas concentrações (entre 2-5%) (GIBEAUT; CAPITA, 1993; CRIVELLARI, 2012).

Figura 7 - Estrutura química da xilana com cadeias laterais.



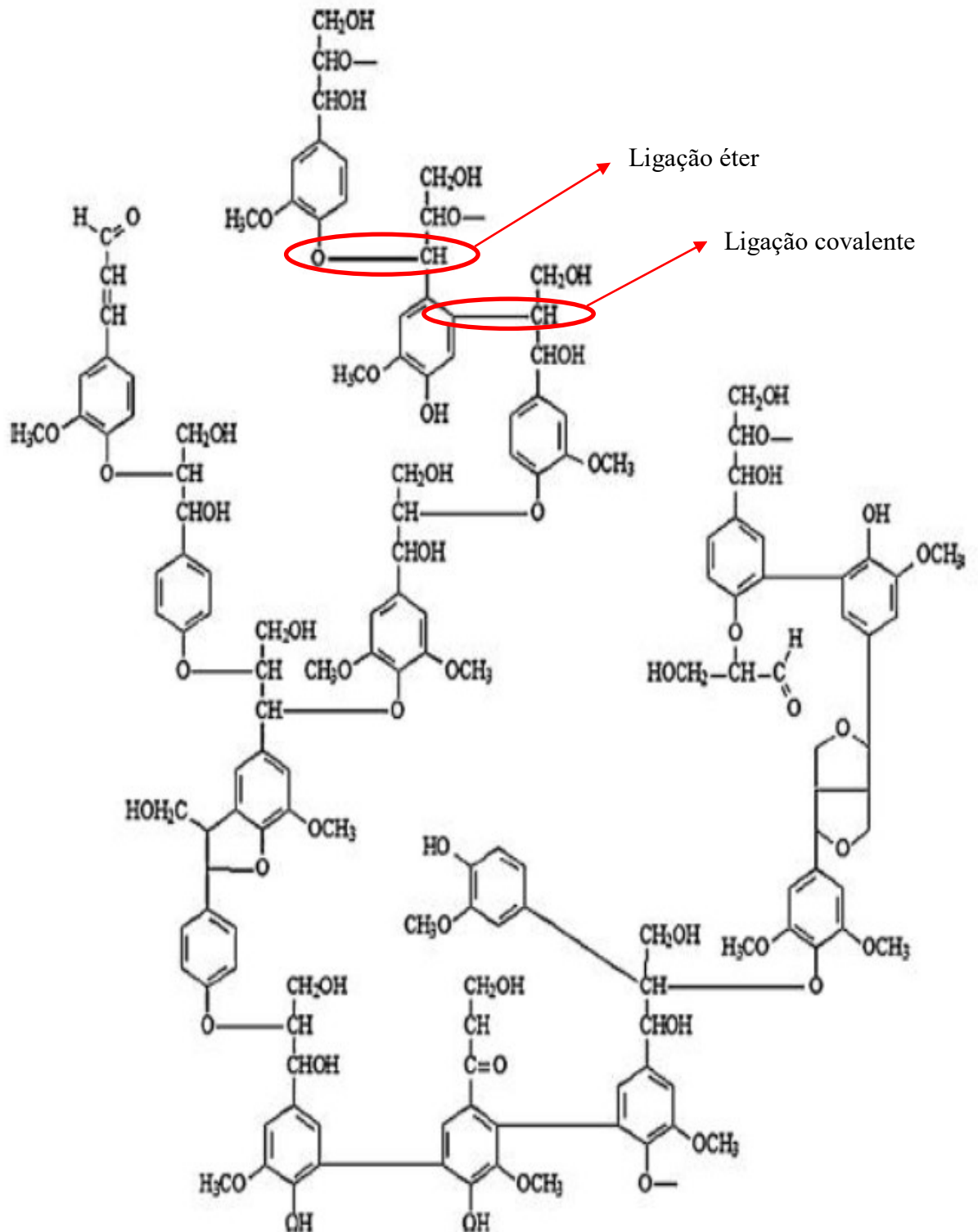
Fonte: BASTAWDE (1992).

2.2.3. *Lignina*

A lignina é uma macromolécula amorfa, heterogênea, de grande complexidade que confere impermeabilidade e resistência a ataques microbianos, intempéries e estresse oxidativo (BALAT, 2011; PHILLIPHI, 2012). Esta macromolécula é formada por unidades fenilpropânicas unidas por diferentes tipos de ligações sendo predominantemente as ligações

tipo éter e covalente (Figura 8), também presente na parede celular vegetal (GUPTA et. al., 2016; DIAS, 2017).

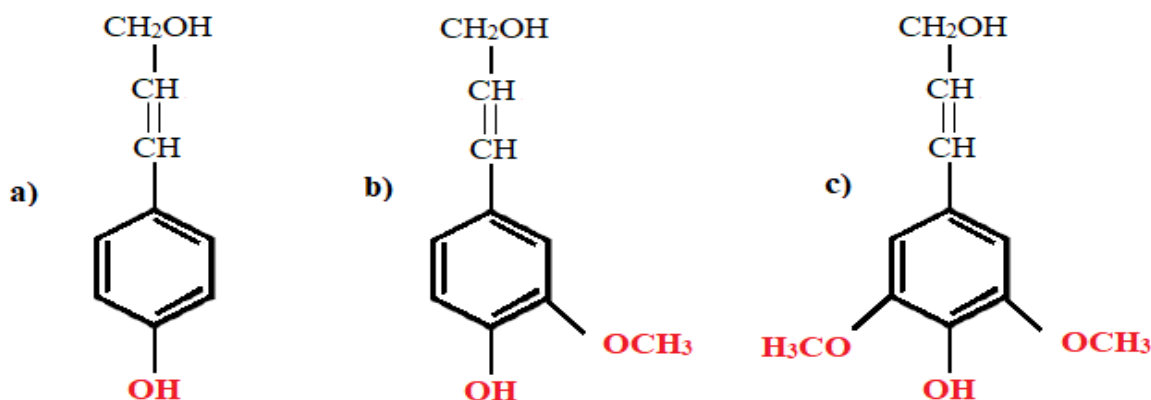
Figura 8 - Esquema da estrutura química da lignina.



Fonte: BRITO (2016).

As unidades fenilpropânicas que formam a estrutura da lignina são originadas dos precursores alcóois, p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (BRITO, 2016, DIAS, 2017). A diferença entre eles está no teor de grupos metoxila (OCH_3) presentes na estrutura do anel aromático (Figura 9).

Figura 9 - Estrutura dos álcoois precursores da lignina: a) álcool p-cumarílico, b) álcool coniferílico, c) álcool sinapílico.



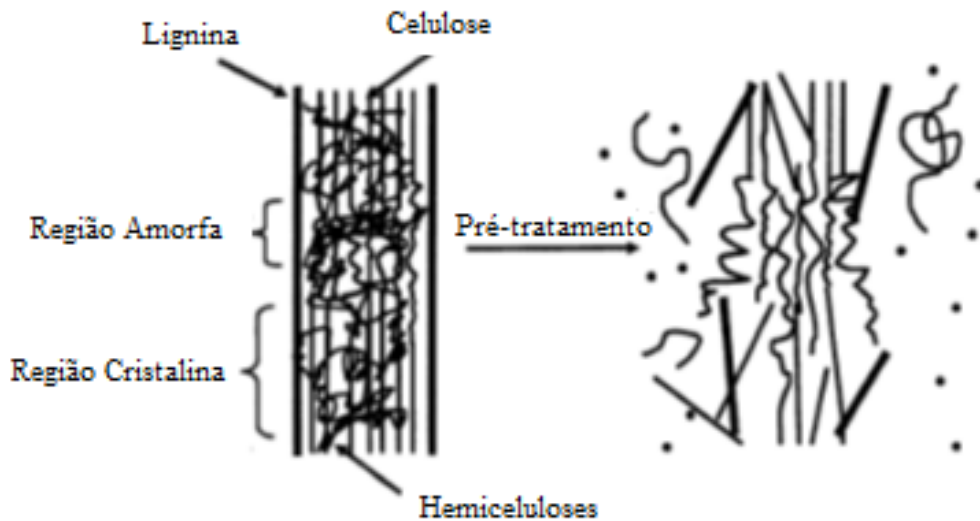
Fonte: Adaptado de RODRIGUES (2016).

A lignina tem como principal finalidade proporcionar força física e proteção para as plantas contra danos mecânicos e microrganismos (GORDOBIL et. al., 2016; RODRIGUES, 2016), afetando diretamente a sacarificação dos resíduos lignocelulósicos, absorvendo de maneira irreversível as enzimas hidrolíticas e conseqüentemente, bloqueando o ataque à celulose (PALONEN et. al., 2004; RODRIGUES, 2016).

2.2.4. Pré-tratamentos de resíduos lignocelulósicos

A etapa de pré-tratamento é necessária para remover a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade da estrutura fibrosa (Figura 10). Além disso, o pré-tratamento pode facilitar o ataque de enzimas microbianas à biomassa, diminuindo, assim, a quantidade de extratos enzimáticos para a etapa seguinte de hidrólise (PANDEY et. al., 2000), que é crucial para a viabilização econômica do processo (CHEN et. al., 2016; BRITO, 2016).

Figura 10 - Representação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.



Fonte: BRAGATTO, 2010.

Existem três tipos de pré-tratamentos: físicos, químicos e biológicos (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016). Os pré-tratamentos físicos (como moagem, trituração e irradiação, dentre outros) objetivam a redução do tamanho das partículas e da cristalinidade, aumentando a superfície de contato e a digestibilidade do material (ZHENG et. al., 2009; BRITO, 2016). Neste método, não ocorre a remoção de lignina e pode ser de alto custo dependendo do tamanho final da partícula que se deseja obter (OLIVEIRA, 2012).

Os tratamentos biológicos utilizam um microrganismo ou uma combinação de microrganismos que degradam os componentes da biomassa, principalmente a lignina e as hemiceluloses. É considerado um método seguro do ponto de vista ambiental, porém, tem a desvantagem de ser um processo lento (ALVIRA et. al., 2010). Além disso, esse processo apresenta baixo gasto energético e pode ser realizado à temperatura ambiente. No entanto, a taxa de lignina e hemiceluloses removida é muito baixa e os microrganismos podem consumir parte dos açúcares acessíveis, levando a um rendimento inferior em açúcares fermentescíveis (CHANDRA et. al., 2012; RODRIGUES, 2016).

Por último, os pré-tratamentos químicos, tais como organossolve, ácido diluído, alcalino e ozonólise, dentre outros, utilizam um composto químico a fim de promover a deslignificação, a diminuição de cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade. Porém, ao final do tratamento, faz-se necessária a remoção de inibidores que podem ser gerados durante o processo (CHANDRA et. al., 2007). Dentre os pré-tratamentos químicos, o método alcalino com NaOH

permite uma deslignificação efetiva, com menor degradação dos açúcares e baixa produção de inibidores (KUMAR et. al., 2009; (KIM et. al., 2016).

2.2.4.1. Pré-tratamentos alcalinos

O pré-tratamento alcalino (PTA) influencia na deslignificação de resíduos lignocelulósicos e na diminuição da cristalinidade da celulose (OLIVEIRA et. al., 2014; RODRIGUES, 2016), porém, com maior efetividade e vantagens em comparação a outros processos químicos. Quando comparado ao processo ácido, o PTA promove baixa degradação dos açúcares, e geração de furanos, que são compostos inibidores, é minimizada. Como vantagem econômica, é possível recuperar diversos sais cáusticos utilizados no processo (SUN; CHENG, 2002; GARCIA, 2009). Além disso, a retirada de grupos acetil e ácido urônico da cadeia da xilana amplia a susceptibilidade do substrato ao ataque enzimático. Esta metodologia pode ser empregada em temperaturas mais baixas, sem necessitar de reatores complexos (MOOD et. al., 2013; RODRIGUES, 2016) e os reagentes alcalinos não ocasionam o desgaste dos equipamentos como os ácidos (MODENBACH; NOKES, 2012; RODRIGUES, 2016). Outra vantagem é a diminuição do grau de polimerização das moléculas de celulose e o aumento da porosidade da estrutura fibrosa (CHANDRA, 2012; RODRIGUES, 2016). No entanto, a utilização em elevada quantidade do reagente pode ser desvantajosa, caso não haja uma fase de recuperação do NaOH (PALLAPOLUA et. al., 2011; RODRIGUES, 2016).

2.3. Hidrólise

Para a obtenção de monossacarídeos fermentescíveis, os materiais lignocelulósicos necessitam de uma etapa de quebra das cadeias polissacarídicas. A hidrólise quebra as ligações glicosídicas nas frações de hemiceluloses e celulose, reduzindo-as a oligossacarídeos e aos seus monômeros constituintes (pentoses e hexoses), que podem ser fermentados a etanol (ROCHA et. al., 2011; SOUSA, 2014).

Os processos de sacarificação mais comuns são: hidrólise ácida e enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). A hidrólise ácida é um processo que resulta na recuperação dos açúcares presentes nas hemiceluloses e na celulose (JÖNSSON; MARTÍN, 2015; VIEIRA, 2016) e em uma composta por lignina (BRITO, 2016). A combinação de baixo pH e alta temperatura hidrolisa as hemiceluloses e as celulosas, portanto, a sua conversão da celulose em D-glicose. As condições mais utilizadas para uma digestibilidade ótima da celulose e das

hemiceluloses são 0,5-4% em massa de ácido sulfúrico (H₂SO₄) em relação à massa seca do material, a 120-210°C por 5-30 minutos (VIEIRA, 2016). A hidrólise com ácido diluído pode hidrolisar de 80-90% da xilana em D-xilose, em uma escala de 150 litros (VAN DER POL et. al., 2014; VIEIRA, 2016). Em relação, a hidrólise da celulose é possível hidrolisar de 50-60% desta em D-glicose (GURGEL, 2010).

Uma das desvantagens da hidrólise ácida é a liberação de substâncias inibidoras do processo fermentativo que são produzidas durante o processo (KUNDU et. al., 2015; CAMESASCA et. al., 2015, BRITO, 2016), ocasionando uma redução das taxas de rendimento e produtividade (SUN et. al., 2011; MATEO et. al., 2013). Os principais inibidores encontrados são os compostos fenólicos formados a partir da lignina (GUPTA et. al., 2012; MATEO et. al., 2015), o furfural (FF) a partir das pentoses, o 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF) a partir das hexoses (MATEO et. al., 2013) e o ácido acético, proveniente da hidrólise dos grupamentos acetila (KUNDU; LEE, 2015; BRITO, 2016). Dessa forma, uma etapa de detoxificação do hidrolisado ácido é necessária, com o objetivo de reduzir a concentração de inibidores, a fim de assegurar o crescimento microbiano durante a fermentação (BRITO, 2016).

A hidrólise enzimática utiliza enzimas produzidas por microrganismos, como celulasas e hemicelulasas, para converter os polissacarídeos em monossacarídeos livres. Este método tem várias vantagens: ausência de reações secundárias, baixa formação de inibidores fermentativos e atuação em condições brandas de temperatura, pH e pressão (SU et. al., 2012). Dentre as limitações, pode-se citar a recalcitrância da lignina e a cristalinidade da celulose que dificultam a ação das enzimas. Em função disso, a estratégia de pré-tratamento adotada deve ser adequada para aumentar a acessibilidade e a atuação das enzimas hidrolíticas (SU et. al., 2012).

2.3.1. Hidrólise enzimática

Esse tipo de sacarificação, aplicada para elevar o rendimento do reaproveitamento da biomassa, ocorre em condições moderadas de pH e temperatura e sem a formação de subprodutos, visto que o catalisador é biológico (ARAÚJO et. al., 2013; RODRIGUES, 2016). As enzimas possuem singularidades: o produto final não é degradado, não demandam grandes investimentos em equipamentos e não há geração de inibidores (RABELO et. al., 2011). Por tais razões, esta rota tecnológica apresenta benefícios sobre os demais processos de bioconversão (RODRIGUES, 2016).

A hidrólise da celulose é executada pela atuação de celulasas altamente específicas, e como consequência da atuação dessas enzimas ocorre a quebra das moléculas de celulose e a

liberação de celobiose e D-glicose (FERREIRA, 2015; RODRIGUES, 2016). A celobiose é um inibidor de celulasas mais forte do que a D-glicose, sendo necessária a rápida transformação em D-glicose pelas β -glicosidases ou celobiasas (FERREIRA, 2015; RODRIGUES, 2016).

Atualmente, a maioria das hidrólises enzimáticas é executada com enzimas comerciais. No entanto, o alto custo dessas enzimas representa um obstáculo na sua utilização em grande escala, limitando a viabilidade comercial do etanol 2G (SIQUEIRA et. al., 2010; ANG et. al., 2013; RODRIGUES, 2016). Após a hidrólise enzimática, são produzidos dois tipos de açúcares: as pentoses (C5) e as hexoses (C6). As hexoses são obtidas tanto da degradação da celulose e de parte das hemiceluloses. Já as pentoses são oriundas apenas da fração de hemiceluloses. Geralmente, a mistura obtida após a hidrólise é utilizada para a fermentação alcoólica, utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na conversão de C6 em etanol (RABELO, 2007; FUGITA, 2010). Outras espécies de leveduras tais como *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolan tannophilus* fermentam também C5 além de C6 (FUGITA, 2010).

2.3.2. Inibidores da hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática pode ser influenciada por vários fatores, que estão relacionados às características do complexo lignocelulósico, da enzima e das condições empregadas no processo. Além disso, as características estruturais do substrato também são importantes, como, por exemplo, o grau de polimerização, cristalinidade e área de superfície da celulose (McMILLAN, 1994; BORTOLAZZO, 2011; AGUIAR, 2017). Uma maior cristalinidade da celulose pode dificultar o acesso devido à preferência dessas enzimas por regiões amorfas (RAMOS, 2000; PEREIRA, 2013).

Durante o processo de hidrólise, a ação catalítica das enzimas pode ser influenciada por efeito de inibição das celobio-hidrolases pelo produto de hidrólise (celobiose). Além da celobiose, as celulasas podem ser desnaturadas pelo efeito do tempo, temperatura, agitação, pressão e pH (SHULERE; KARGI, 1992; PEREIRA, 2013). Outro fator que pode influenciar a hidrólise enzimática é a presença de lignina no material, que pode impedir o acesso das celulasas à celulose e ainda pode realizar ligações irreversíveis com as enzimas devido à adsorção à lignina, sendo necessária sua remoção prévia através de um pré-tratamento (McMILLAN, 1994; BORTOLAZZO, 2011; AGUIAR, 2017).

2.4. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um conjunto de reações que ocorrem no interior da célula, com a finalidade de gerar energia para o crescimento e preservação das atividades metabólicas dos microrganismos (BRITO, 2016). Como subproduto desse processo bioquímico, ocorre a conversão de açúcares em etanol e dióxido de carbono (LEHNINGER et. al., 2000; FUGITA, 2010).

O etanol gerado ao longo da fermentação é dependente da quantidade de açúcares presentes no meio. A produção de etanol 1G se inicia pela ação da exoenzima invertase (sacarase) que converte o dissacarídeo sacarose do caldo de cana nos monossacarídeos D-glicose e frutose. No caso do etanol 2G, sua síntese é proveniente da fermentação dos açúcares C6 e C5 presentes nos hidrolisados de biomassas lignocelulósicas. Esses monossacarídeos são assimilados pela levedura (aeróbio facultativo), que os metaboliza durante a fermentação em condições de anaerobiose ou na respiração em condições de aerobiose (AMORIM et. al., 1996; FUGITA, 2010).

2.4.1. Inibidores da fermentação alcoólica

A produção do etanol 2G a partir de hidrolisados não fornece uma condição fisiológica ideal para a levedura, sendo *S. cerevisiae* a mais utilizada atualmente. Outras espécies de leveduras também têm sido utilizadas, tais como *Candida shehatae*, *Sheffersomyces stipitis* e a estudada no presente trabalho, *Galactomyces geotrichum*. Diversos fatores de estresse podem surgir durante o processo fermentativo, o que compromete as condições da produção do etanol, tais como: altas concentrações de açúcar e etanol, temperaturas elevadas, variações de pH e presença de compostos tóxicos (OLIVA-NETO et. al., 2015; RODRIGUES, 2017). Todos esses fatores estressantes são impostos às leveduras de forma simultânea ou sequencialmente (DORTA, 2006; RODRIGUES, 2017).

A concentração de açúcares no hidrolisado deve ser apropriada à concentração do inóculo, para que não ocorra ausência de células fermentativas. A concentração elevada de açúcares no meio pode prejudicar a viabilidade celular (VC) e contribuir para o desenvolvimento de contaminantes, formação de subprodutos, resultando em fermentações lentas e incompletas e, conseqüentemente, acarretando menores rendimentos alcoólicos (ANGELIS et. al., 1992; RODRIGUES, 2017).

A concentração de etanol pode também ser alterada pela alta temperatura no meio. As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol encontram-se dentro da faixa de 26 a 38°C (RODRIGUES, 2017). O etanol pode inibir o crescimento e causar inativação enzimática, levando a uma diminuição de VC (BASSO et. al., 2011; RODRIGUES, 2017). Outro fator que interfere na fermentação alcoólica é o pH do hidrolisado que deve estar na faixa de 4,5 a 5,5 (RODRIGUES, 2017).

Além dos fatores citados acima, a presença de compostos tóxicos também pode influenciar o processo fermentativo (ácidos orgânicos, compostos fenólicos e glicerol (propano-1,2,3-triol)). A síntese de subprodutos e a produção de alguns ácidos orgânicos em excesso podem estar associadas à presença de microrganismos contaminantes (AMORIM et. al., 2011). A presença de ácidos orgânicos no meio fermentativo ocasiona em ampliação do consumo de ATP pela levedura. Sendo assim, parte do ATP que seria empregado para o crescimento pode ser deslocado para a conservação de seu pH interno (NARENDRANATH et. al., 2001; FUGITA, 2010).

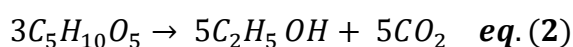
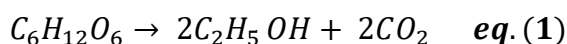
Dentre os ácidos orgânicos que demonstram propriedades inibitórias das células de levedura, citam-se os ácidos acético, succínico (butanodióico) e láctico (2-hidroxiopropanóico). O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico, $C_3H_6O_3$) é encontrado no meio fermentativo devido à contaminação por bactérias lácticas (OLIVA-NETO, 2013; RODRIGUES, 2017). O ácido acético ($C_2H_4O_2$) pode ser gerado durante fermentação alcoólica, tanto pela levedura como por bactérias contaminantes, e pode causar redução do crescimento e inibição do processo (WHITING et. al., 1994; RODRIGUES, 2017). O ácido succínico (ácido butanodióico, $C_4H_6O_4$), produzido por bactérias e leveduras, auxilia no metabolismo energético e sua ação sinérgica com o etanol tem atividade antibacteriana (RODRIGUES, 2017).

Os compostos fenólicos podem inibir a bioconversão e a atividade enzimática, prejudicando a integridade e propriedades da membrana celular (HEIPIEPER et. al., 1994; FUGITA, 2010). Os derivados de furanos (FF e HMF) são compostos que influenciam os microrganismos, limitando suas atividades enzimáticas e biológicas, quebrando o DNA e inibindo a síntese de RNA e proteínas (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988; MODING et. al., 2002; FUGITA, 2010). O glicerol (propano-1,2,3-triol) é um dos principais subprodutos obtidos durante a fermentação do etanol. Cerca de 4-8% do substrato são transformados em glicerol (propano-1,2,3-triol), equivalendo entre 0,08 a 0,15 $g \cdot g^{-1}$ de etanol. Ele pode ser empregado como fonte única de carbono sob condições aeróbias, ou ser um subproduto quando a D-glicose e/ou outros açúcares fermentescíveis são convertidos em etanol (NEVOIGT et. al., 1997; GOMBERT; VAN MARIS, 2015; RODRIGUES, 2017). Desta forma, a diminuição da

quantidade de glicerol gerada no decorrer da fermentação pode afetar positivamente o rendimento de etanol.

2.4.2. Fermentação de hexoses (C6) e pentoses (C5)

A conversão de hexoses (C6) e pentoses (C5) em etanol ocorre por vias metabólicas distintas, que podem ser representadas de forma simplificada de acordo com as Equações 1 e 2, respectivamente:



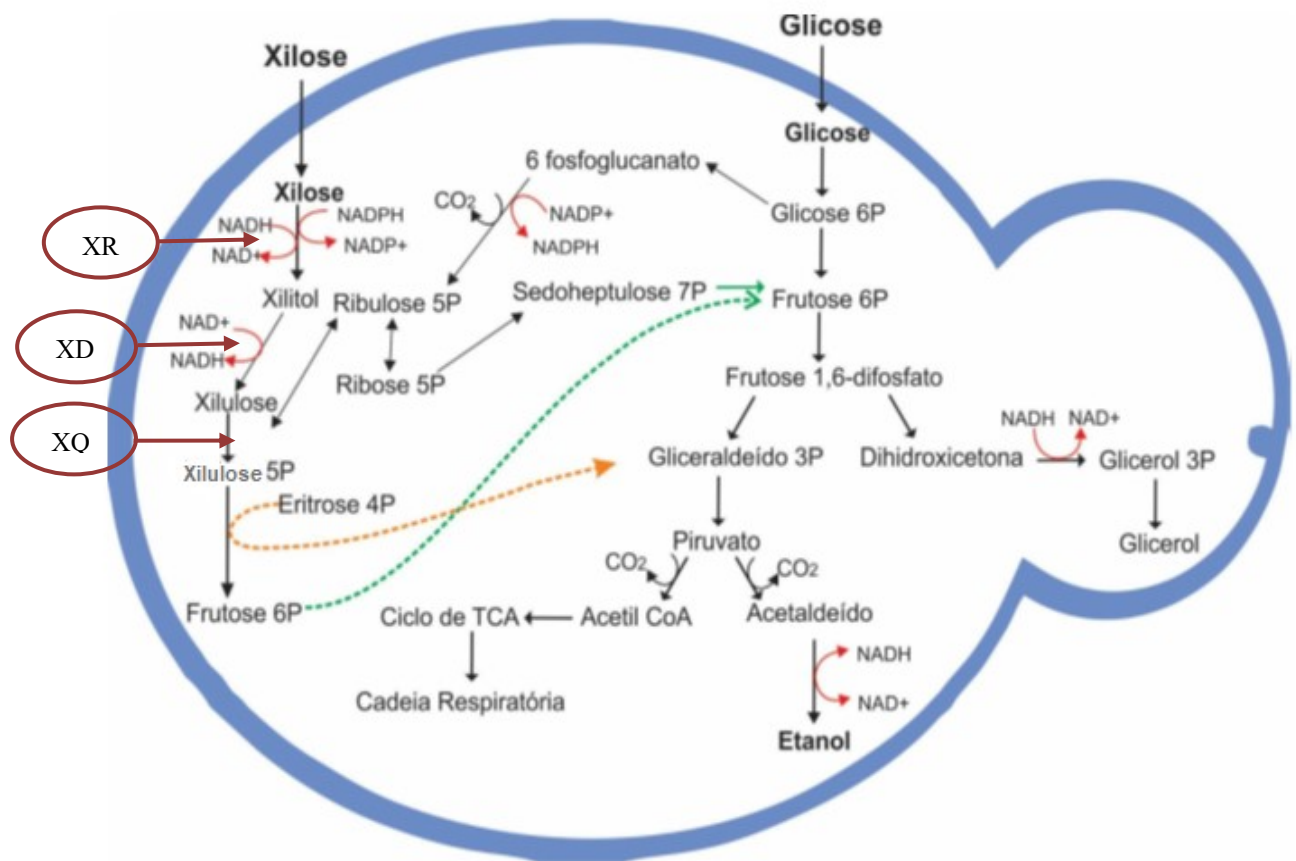
Na fermentação de C6, o agente fermentativo mais empregado é a levedura *S. cerevisiae*, que converte hexoses em etanol e CO₂ como produtos essenciais, além de glicerol (propano-1,2,3-triol), ácido succínico (ácido butanodióico), ácidos voláteis e ésteres (Figura 11) como metabólitos secundários (AMORIM et. al., 2005; RODRIGUES, 2016). Em condições de aerobiose, a levedura metaboliza os carboidratos para formação de ATP e biomassa. Em condições de anaerobiose e em elevadas concentrações de açúcares, a levedura metaboliza D-glicose em etanol e CO₂, gerando duas moléculas de ATP e baixa produção de biomassa (VENTURINI et. al., 2013; RODRIGUES, 2017).

A produção do etanol por *S. cerevisiae* ocorre no citoplasma da célula pela via glicolítica (glicólise), onde a glicose é oxidada a piruvato que é, em seguida, descarboxilado a acetaldeído e CO₂ e reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase (FERRARI, 2013; RODRIGUES, 2017). Como *S. cerevisiae* já está adaptada para a fermentação devido a sua alta tolerância ao etanol e crescimento em pH baixos é o agente fermentativo mais empregado na fermentação de C6 (BAEYENS et. al., 2015; BRITO, 2016). Algumas espécies de leveduras têm habilidade em metabolizar pentoses (C5) e podem converter D-xilose a etanol através da via metabólica das pentoses-fosfato (Figura 11).

A primeira fase do metabolismo da D-xilose constitui-se no transporte do açúcar através da membrana celular mediado por transportadores de D-glicose na ausência de um transportador específico para C5 (RAO, BHADRA, SHIVAJI, 2008; BARBOSA, 2017). No citoplasma, a D-xilose passa, então, por duas reações de oxirredução sendo convertida a xilitol e posteriormente à xilulose, que sofre uma fosforilação para xilulose 5-fosfato (xilulose 5P). A conversão da D-xilose a xilitol é realizada pela enzima xilose redutase (XR), primeira enzima desta via metabólica, sendo esta reação dependente das coenzimas NADH ou NADPH

(JEFFRIES, 1983; FUGITA, 2010). O xilitol produzido pode então ser excretado no meio ou ser oxidado à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XD), com a atuação de NAD^+ (SLININGER et. al., 1987; FUGITA, 2010). A xilulose formada é fosforilada pela enzima xilulose quinase (XQ), produzindo então xilulose 5-fosfato, que é metabolizada na via das fosfopentoses (WEEB; LEE, 1990; FUGITA, 2010). Os metabólitos decorrentes da via das fosfopentoses, frutose-6P e gliceraldeído-3P, são metabolizados a piruvato na glicólise, que pode então ser fermentado a etanol, pela atuação das enzimas piruvato descarboxilase e etanol desidrogenase (FUGITA, 2010).

Figura 11 – Metabolismo de D-xilose e D-glicose em leveduras fermentadoras de D-xilose e D-glicose.



Fonte: Adaptado de HAHN-HAGERDAL (1994); BARBOSA (2017).

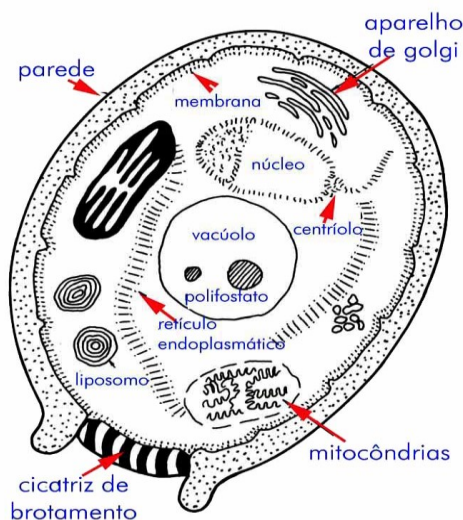
A fermentação da D-xilose em condições anaeróbicas é extremamente baixa, obtendo-se o xilitol como principal produto (JO et. al., 2016; BARBOSA, 2017). Outra possibilidade para monitorar o equilíbrio das reações de oxirredução é o provimento de oxigênio em um baixo nível e equilibrado para as leveduras, ou ainda, incorporar D-glicose ao meio fermentativo

propiciando a co-fermentação de D-glicose e D-xilose (PROMPT, 2012; MATSUSHIKA et. al., 2008; HOU et. al., 2012; BARBOSA, 2017).

2.4.2.1. Leveduras fermentadoras de C5

As leveduras são microrganismos unicelulares heterotróficos que fazem parte do reino *Fungi* e demonstram peculiaridades, como por exemplo, presença de parede celular rígida rica em polissacarídeos e manoproteínas (Figura 12) (KURTZMAN et. al., 2011; BARBOSA, 2017).

Figura 12 - Esquema mostrando as estruturas de uma levedura típica.



Fonte: CRUZ (2016).

As leveduras apresentam células esféricas, ovais, elípticas, apiculadas, triangulares, entre outras (BARBOSA, 2017) e possuem de 1 a 8 μm de largura e 3 a 15 μm de comprimento (RODRIGUES, 2017). A multiplicação celular pode ser sexuada ou assexuada por brotamento ou por cissiparidade (KURTZMAN et. al., 2011, SOARES, 2015; BARBOSA, 2017). Algumas espécies demonstram dimorfismo sexual e podem apresentar pseudo-hifa e hifas verdadeiras durante o seu crescimento (DIAS, SCHWAN, 2010; BARBOSA, 2017). Esses microrganismos são comumente encontrados no solo, nas superfícies de vegetais, principalmente em flores e frutos, no trato intestinal de animais e em líquidos açucarados (BLACKWELL et. al., 2007; SATYANARAYANA; KUNZE, 2009; VALINHAS, 2016).

Diversas espécies de leveduras são eficazes na bioconversão de açúcares a etanol, porém, a maioria destas fazem o uso predominante da D-glicose. Entretanto, o aproveitamento

da D-xilose juntamente com a D-glicose é fundamental para o progresso econômico e para a produção sustentável de biocombustíveis e outros bioprodutos a partir de biomassas lignocelulósicas (KO et. al., 2016; VALINHAS, 2016).

Um dos primeiros relatos sobre fungos capazes de fermentar D-xilose em etanol surgiu por volta da década de 20, com a espécie *Fusarium lini* (SUIHKO; ENARI, 1981; GIBBS et. al., 1953; VALINHAS, 2016). A partir dos anos 80, novas espécies fermentadoras de D-xilose foram descritas, como *Candida shehatae*, isolada de solo (DU PREEZ; VAN DER WALT, 1983; VALINHAS, 2016). Desde então, várias espécies vêm sendo estudadas, dentre estas, destacam-se *Sheffersomyces stipitis* e *Spathaspora arboriae*, isoladas a partir de madeira em decomposição (KRAHULEC et. al., 2012; BRITO, 2016) e *Spathaspora passalidarum*, isolada do intestino de besouros (HOU, 2012; BRITO, 2016). As duas últimas espécies são reconhecidas pela sua capacidade de fermentar a D-xilose a etanol a partir de material vegetal (DA CUNHA-PEREIRA et. al., 2011; LONG et. al., 2012; BRITO, 2016).

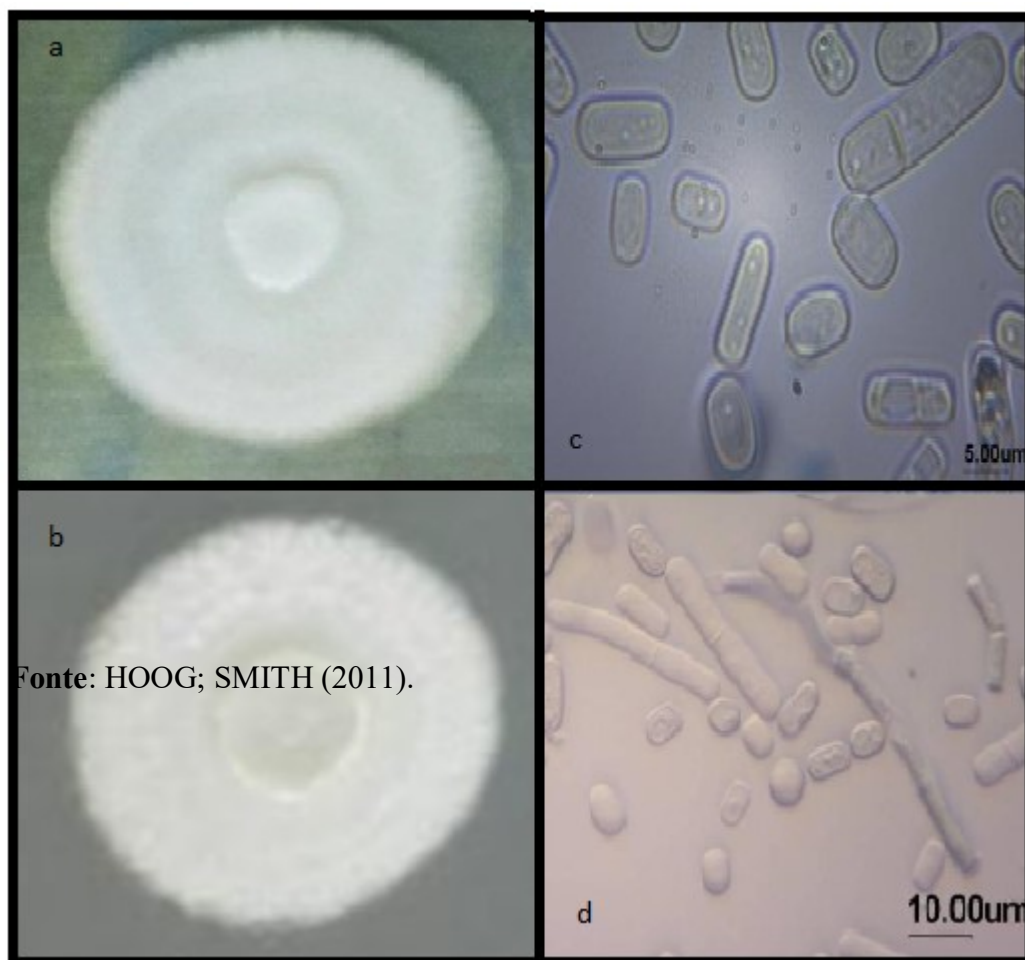
Várias outras espécies de leveduras também foram relatadas como capazes de fermentar D-xilose, como *Brettanomyces*, *Clavispora* e *Schizosaccharomyces*, inúmeras espécies de *Candida* (*C. tenuis*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. blankii*, *C. friedrichii*, *C. solani*, *C. intermedia* e *C. parapsilosis*), *Debaromyces* (*D. nepalensis* e *D. polymorpha*) e *Galactomyces geotrichum* (GÁRDONYI et. al., 2003; NGUYEN et. al., 2006; RAO; BHADRA; SHIVAJI, 2008; VALINHAS, 2016; MATOS et. al., 2018). Outras espécies também foram descritas, tais como: *Pachysolen tannophilus* (CHENG et. al., 2008; VIEIRA, 2016); *Kluyveromyces marxianus* (MARGARITIS; BAJPAI, 1982; VIEIRA, 2016); *Pichia stipitis* (CANILHA et. al., 2010; VIEIRA, 2016); *Candida guilliermondii*; *Candida blankii*, *Candida tenuis*, *Brettanomyces naardenensis*, *Pichia segobiensis*, *Kluyveromyces cellobivorus*, *Debaryomyces nepalensis*, *Debaryomyces polimorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Candida succiphila*, *Candida jeffriesii*, *Candida intermedia*, *Hansenula polymorpha* e *Debaryomyces hanseii* (PROMPT, 2012; VIEIRA, 2016).

2.4.2.1.1. *Galactomyces geotrichum*

O gênero *Galactomyces* compreende leveduras artroconidiais do filo *Ascomycota* (KAEWWICHIAN et. al., 2010; VALINHAS, 2016). A espécie *Galactomyces geotrichum* é classificada como o teleomorfo da espécie *Geotrichum candidum*. Desse modo, ambas as denominações se referem ao mesmo organismo, porém recebem nomenclaturas diferentes dependendo de sua fase sexual: quando é evidenciada a fase assexuada (anamorfo) é nomeada

como *Geotrichum candidum* e na fase sexual (teleomorfo) como *Galactomyces geotrichum*. Esta levedura apresenta superfície com estria concêntrica, borda e aspecto filamentosos e crescimento radial (Figura 13 a e b). De acordo com Valinhas (2016), o gênero *Galactomyces* apresenta colônias brancas, filamentosas, geralmente com aspecto ressecado e hifas verdadeiras (Figura 13 c e d).

Figura 13 – Aspecto macroscópico da linhagem *Galactomyces geotrichum* (UFVJM-R150) cultivada no meio YEPM por 48 horas, mostrando a forma circular, coloração branca, aspecto filamentosos e estrias concêntricas (a e b). Microrganismos com hifas verdadeiras septadas com desarticulação em artroconídeos cilíndricos (c e d).



Fonte: Valinhas (2016) e Barbosa (2018).

Segundo Valinhas (2016), a espécie *Galactomyces* apresenta grande distribuição e é frequentemente identificada em todos os tipos de substratos úmidos, especialmente como ocasionador de decomposição em frutos maduros. A linhagem *G. geotrichum* UFVJM-R150 estudada no presente trabalho foi isolada de tomate em podridão (VALINHAS, 2016). Esta

levedura foi escolhida para a fermentação alcoólica, pois a mesma não foi descrita na literatura, até o momento, para a fermentação de hidrolisados de bagaço de cana. Desta forma, a viabilidade desta espécie para a fermentação alcoólica de hexoses e pentoses a partir de hidrolisados de BT foi avaliada no presente trabalho.

3. **OBJETIVOS**

Obter etanol de 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado empregando as leveduras *S. cerevisiae* e *G. geotrichum*.

3.1. Objetivos específicos

- Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar com NaOH;
- Caracterização química do bagaço bruto (BB) e pré-tratado (BT);
- Sacarificação enzimática de BT com complexo comercial Cellic Ctec3;
- Dosagem de açúcares redutores totais (ART) e de D-glicose nos hidrolisados;
- Fermentação alcoólica dos hidrolisados utilizando *G. geotrichum* (UFVJM-R150) e *S. cerevisiae* (fermento comercial);
- Quantificação de açúcares, etanol e outros subprodutos nos hidrolisados e fermentados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4. **MATERIAIS E MÉTODOS**

4.1. Bagaço de cana-de-açúcar

Amostras de bagaço de cana-de-açúcar (BC) obtidas da Usina Vale do Tijuco (Uberaba, MG) foram lavadas com água destilada à temperatura ambiente para a remoção dos açúcares residuais impregnados após a moagem da cana. Após este procedimento, o bagaço foi seco em estufa a 50°C por 48 horas, triturado em liquidificador e armazenado em sacos plásticos livres de umidade.

4.2. Pré-tratamento alcalino (PTA)

Cerca de 100 gramas de BC foram pesadas e acondicionadas em um balão, com 2,5 L de solução de NaOH 2% (m/v). Esta mistura foi submetida a aquecimento com manta aquecedora sob refluxo durante 4 horas a 100°C, de acordo com Rodrigues et. al. (2017). O bagaço tratado (BT) foi posteriormente filtrado e lavado com água destilada até a neutralização e seco em estufa por 12 horas a 50°C e armazenado à temperatura ambiente até a sua utilização.

4.3. Caracterização química do bagaço bruto (BB) e pré-tratado (BT)

A caracterização química do bagaço de cana bruto (BB) e pré-tratado (BT) foi realizada para avaliar o efeito do pré-tratamento na estrutura e composição do substrato. Todas as análises foram realizadas em triplicatas (LAMOUNIER et. al., 2017).

4.3.1. Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com a norma TAPPI T264 OM-88, com pequenas modificações. Cerca de 2,000 gramas de bagaço (BB e BT) foram acondicionadas em estufa a 105°C por 2 horas, resfriadas em dessecador até atingir temperatura ambiente e pesadas. Posteriormente, o conjunto foi mantido em estufa por 1 hora a 105°C e os procedimentos de arrefecimento e pesagem foram repetidos até se atingir uma massa constante. Desta forma, o teor de umidade foi calculado conforme a equação 3:

$$T_u(\%) = \frac{m_{rau} - m_{ras}}{m_{au}} \times 100 \quad \text{eq. (3)}$$

Onde:

T_u = Teor de umidade

m_{rau} = Massa do recipiente + amostra úmida;

m_{ras} = Massa do recipiente + amostra seca;

m_{au} = Massa da amostra úmida.

4.3.2. Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado de acordo com a norma TAPPI T211 OM-93. Cerca de 1,000 grama de bagaço foi adicionado em um cadinho e o conjunto foi aquecido a 800°C em mufla por 2 horas. Em seguida, a amostra foi resfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesada. O teor de cinzas foi quantificado pela equação 4:

$$T_c(\%) = \frac{m_{cac} - m_{cad}}{m_a} \times 100 \quad \text{eq. (4)}$$

Onde:

T_c = Teor de cinzas;

m_{cac} = Massa do cadinho + amostra calcinada;

m_{cad} = Massa do cadinho;

m_a = Massa da amostra.

4.3.3. Determinação do teor de lignina Klason insolúvel

Para a determinação do teor de lignina Klason insolúvel, cerca de 1,000 grama de amostra seca foi submetida à maceração (em almofariz) com 15,0 mL de H₂SO₄ 72% (m/v) (d=1,6389 g.mL⁻¹), até obter-se um máximo de desfibramento, por 2 horas à temperatura ambiente (TAPPI T13M-5). Em seguida, a mistura foi transferida para um balão de 1,0 L, completando o volume até 0,575 L com água destilada para a concentração final de H₂SO₄ a 3% (m/v), seguido de aquecimento sob refluxo por 4 horas à temperatura de ebulição da mistura.

Após o resfriamento, a solução foi filtrada em um funil de vidro sinterizado nº 4 para a retenção da lignina Klason insolúvel. O material retido no funil foi seco em estufa a 105°C por 12 horas, resfriado em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesado. O filtrado foi coletado para quantificação de lignina Klason solúvel. O teor de lignina insolúvel foi determinado pela equação 5:

$$L_{ki}(\%) = \frac{m_{ki} - m_c}{m_a} \times 100 \quad \text{eq. (5)}$$

Onde:

L_{ki} = Lignina Klason insolúvel;

m_{fs} = Massa do funil seco;

m_{ki} = Massa do funil somada à massa de lignina, após a secagem em estufa;

m_a = Massa da amostra.

4.3.4. Determinação do teor de lignina Klason solúvel

A concentração de lignina solúvel em meio ácido foi analisada através da espectroscopia na região do ultravioleta. As medições de absorvância do filtrado foram realizadas a 215 e 280 nm no espectrofotômetro. O teor ($g.L^{-1}$) de lignina Klason solúvel foi calculado pela equação 6:

$$C_{ls}(g.L^{-1}) = \frac{(4,53 \times A_{215}) - A_{280}}{300} \quad \text{eq. (6)}$$

Onde:

$C_{ls}(g.L^{-1})$ = Concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido.

A_{215} = Valor da absorvância a 215 nm.

A_{280} = Valor da absorvância a 280 nm.

Esses valores de absorvância se referem à necessidade de se fazer uma retificação para os compostos de furfural produzidos durante a hidrólise, que prejudicam a medição da lignina solúvel. A absorvância em 215 nm é a medida da concentração de lignina solúvel enquanto que

a absorvância em 280 nm é uma reparação para os compostos de furfural. Portanto, a equação (6) é resultante da resolução simultânea de duas equações:

$$A_{280} = 0,68 C_D + 18 C_L \quad \text{eq. (7)}$$

$$A_{215} = 0,15 C_D + 70 C_L \quad \text{eq. (8)}$$

Onde:

A_{280} = Valor da absorvância a 280 nm;

A_{215} = Valor da absorvância a 215 nm;

C_D = Concentração de carboidratos;

C_L = Concentração da lignina solúvel.

Os valores 0,68 e 0,15 correspondem, respectivamente, as absorvidades molares dos produtos de degradação dos carboidratos em 280 e 215 nm, respectivamente, e os valores 18 e 70 são as respectivas absorvidades molares da lignina solúvel em 280 e 215nm, respectivamente.

O teor de lignina solúvel (%) foi determinado pela equação 9, sendo que a massa de lignina solúvel seca foi convertida de g.L^{-1} para g pela equação 10;

$$L_{ks}(\%) = \frac{m_{ks}}{m_a} \times 100 \quad \text{eq. (9)}$$

Onde:

L_{ks} = Lignina Klason solúvel;

m_{ks} = Massa de lignina solúvel;

m_a = Massa da amostra.

$$M_{ks}(g) = C_{ls} \times 0,575 \quad \text{eq. (10)}$$

Onde:

m_{ks} = Massa de lignina solúvel;

C_{ls} = Concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido obtida na equação 6.

0,575 = Fator de conversão de g.L^{-1} para g (Como a amostra inicial tinha um volume de 575 mL, multiplicando-se a C_{ls} por 0,575 L, é obtida a massa de lignina solúvel (m_{ks}).

4.3.5. Determinação do teor de holocelulose

Holocelulose é o termo aplicado para designar os carboidratos totais existentes em uma célula vegetal após a extração da lignina, sendo composta por hemiceluloses e celulose. Este processo consiste na deslignificação utilizando clorito de sódio e está baseado na reação entre lignina, dióxido de cloro (ClO_2) e íon hipoclorito (ClO^-), produtos gerados nas reações redox do íon clorito (ClO_2^-) em meio ácido (BROWING, 1967) (Equação 11):



Em um erlenmeyer, foram colocados 250 mL de água destilada e 5,000 gramas de amostra seca. A mistura foi incubada em banho-maria a 75°C e 2,0 mL de ácido acético 10% (m/v) e 3,0000 gramas de clorito de sódio foram adicionados. Em seguida, o frasco foi tampado para evitar a perda do gás gerado no decorrer da reação. Após 1 hora, foram adicionados 2,0 mL de ácido acético 10% e 3,0000 gramas de clorito de sódio. Esse procedimento foi repetido por duas vezes.

Após esse processo, a mistura foi então resfriada em banho de gelo, filtrada em funil de vidro sinterizado nº 1 e lavada com água destilada a 5°C até que o resíduo fibroso exibisse uma coloração esbranquiçada e o pH permanecesse semelhante ao da água utilizada na lavagem. Após essa etapa, o funil contendo o resíduo fibroso foi seco a 105°C por 6 horas, resfriado em dessecador e pesado para calcular o rendimento em holocelulose. O teor de holocelulose foi determinado pela equação 12:

$$T_H(\%) = \frac{m_{fh} - m_f}{m_a} \times 100 \quad \text{eq. (12)}$$

Onde:

T_H = Teor de holocelulose;

m_{fh} = Massa do funil mais holocelulose;

m_f = Massa do funil seco;

m_a = Massa da amostra.

4.3.6. Teor de celulose

O tratamento da holocelulose, obtida no item 4.3.5, com hidróxido de potássio (KOH) 5 e 24% ocasiona em valores de perda de massa que, adicionados, constituem a fração de hemiceluloses. Desta forma, celulose é designada como a massa do resíduo fibroso após as duas extrações com KOH 5 e 24% (BROWING, 1967). Foram transferidas 3,000 gramas de holocelulose seca para um erlenmeyer, juntamente com 10 mL de solução de KOH 5% (m/v) e então, foi produzida uma atmosfera inerte dentro do frasco pelo borbulhamento de gás nitrogênio. O erlenmeyer foi vedado e submetido à agitação magnética por 2 horas. A mistura resultante foi filtrada em funil de vidro sinterizado nº 1, lavada com 50 mL de solução de KOH 5% (m/m) e com 100 mL de água destilada.

O mesmo procedimento de extração foi realizado com a solução de KOH 24% (m/v). Este resíduo retido no funil foi lavado, empregando-se 25 mL de KOH 24%, 50 mL de água destilada, 25 mL de ácido acético 10% (m/v) e 100 mL de água destilada. Após a extração dos componentes solúveis, o resíduo foi lavado com 50 mL de acetona, seco a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 6 horas e pesado. O teor de celulose foi determinado pela equação 13:

$$T_{cel}(\%) = \frac{m_{fcel} - m_f}{m_{ah}} \times 100 \quad \text{eq. (13)}$$

Onde:

T_{cel} = Teor de celulose;

m_{fcel} = Massa do funil mais celulose;

m_f = Massa do funil seco;

m_{ah} = Massa da amostra.

4.3.7. Teor de hemiceluloses

O teor de hemiceluloses foi estabelecido como a diferença entre os teores de holocelulose e celulose.

4.4. Dosagem de celulases totais (FPase)

A atividade de celulases totais por unidades de papel de filtro (FPU) da enzima comercial Cellic Ctec3 (Novozymes) foi determinada a 50°C utilizando uma mistura de reação contendo 1 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8, 0,5 mL de extrato enzimático e uma fita de papel de filtro (1 cm de largura por 6 cm de comprimento, pesando aproximadamente 50 mg) como substrato (GHOSE, 1987). Após 60 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 3 mL de ácido 3,5-dinitrosalísílico (DNS) e o volume final foi homogeneizado e levado ao banho de ebulição por 5 minutos. Após esse período, os tubos contendo as amostras foram incubados em banho de gelo e adicionados de 20 mL de água destilada. Após 20 minutos, o papel de filtro foi macerado com auxílio de um bastão de vidro. A concentração de D-glicose liberada foi medida a 540 nm no espectrofotômetro UV-visível BEL engineering.

4.5. Hidrólise enzimática

As hidrólises enzimáticas foram realizadas em frascos do tipo erlenmeyer de 50 mL, selados com tampas de látex, utilizando o complexo enzimático Cellic Ctec3 (10 FPU.g⁻¹ de celulose) e tampão citrato de sódio (0,1 mol.L⁻¹, pH 4,8), para um volume final de 25 mL. Foram avaliadas as condições de concentração de substrato (3 e 10% - m/v) de bagaço de cana pré-tratado (BT) e o tempo de hidrólise (24 e 72 horas). Os frascos foram incubados em agitador orbital a 150 rpm e 50°C.

4.5.1. Quantificação de açúcares redutores totais (ART)

Os hidrolisados foram filtrados, centrifugados a 2700 rpm por 20 minutos e utilizados para análises quantitativas de açúcares redutores totais (ART) pelo método do DNS a 540 nm em espectrofotômetro UV-visível BEL engineering (MILLER, 1959). As reações foram realizadas com 100 µL de hidrolisado e 100 µL de DNS por 10 minutos no banho-maria em ebulição. Após esse período, foram adicionados 800 µL de água destilada. Todas as dosagens foram realizadas em duplicatas. A concentração (g.L⁻¹) de ART foi calculada pela equação 14, a partir de uma solução padrão de glicose 1 g.L⁻¹:

$$ART (g.L^{-1}) = \left(\frac{((ABS_t + 0,0393/0,0035)/0,1) \times d}{1000} \right) \text{ eq. (14)}$$

Onde:

ABS_t = Absorbância do teste;

d = Diluição feita no hidrolisado antes da leitura;

1000 = Fator de conversão de $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para g.L^{-1} ;

$0,1$ = Volume de amostra (hidrolisado) utilizado para a análise.

4.5.2. Determinação da concentração de D-glicose livre (GOD-POD)

Para a quantificação da D-glicose liberada nos hidrolisados, foi realizado o teste da glicose oxidase (GOD-POD), utilizando-se um kit enzimático contendo um reativo monoreagente (Glicose Liquiform, Labtest®). Este método é baseado na oxidação da D-glicose pela enzima glicose oxidase (GOD), formando peróxido de hidrogênio, que é então utilizado para a produção de coloração rosa após a ação de uma peroxidase. Neste ensaio, 10 μL de cada hidrolisado e 1 mL do reagente foram adicionados em um microtubo e mantidos por 10 minutos a 37°C em banho-maria. Após o término da reação, foi realizada a leitura da absorbância a 505nm em um espectrofotômetro de UV-visível BEL engineering. A concentração (g.L^{-1}) de D-glicose livre foi calculada pela equação 15, a partir de uma solução padrão de glicose 1 g.L^{-1} :

$$\text{Glicose } (g.L^{-1}) = \left(\left(\frac{ABS_t}{ABS_p} \right) \times 100 \right) \times 0,01 \text{ eq. (15)}$$

Onde:

ABS_t = Absorbância do teste;

ABS_p = Absorbância do padrão;

$0,01$ = Fator de conversão de mg.dL^{-1} para g.L^{-1} ;

4.5.3. Determinação dos teores de pentoses

Após a obtenção da concentração de ART e D-glicose nos hidrolisados, calculou-se a concentração de pentoses pela equação 16:

$$[\text{Pentoses (g.L}^{-1}\text{)}] = [\text{ART}] - [\text{Glicose}] \text{ eq. (16)}$$

4.5.4. Determinação das concentrações de açúcares e inibidores por CLAE

As concentrações de açúcares livres nos hidrolisados foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), no Laboratório Multiusuários de Análises Físico-Químicas, da Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia (FEQUI/UFU).

As amostras foram diluídas com a fase móvel (solução aquosa 0,1% ácido fosfórico – H_3PO_4), filtradas em membrana (0,20 μm tamanho dos poros, Chromafil[®] Xtra CA-20/25) e injetadas no sistema cromatográfico (Shimadzu[™] model LC-20A Prominence), utilizando coluna Supelcogel[™] C-610H column, equipado com detectores ultravioleta (operando em comprimento de onda de 210 nm) e de índice de refração, para detectar os açúcares, os inibidores e os ácidos orgânicos. As análises foram realizadas empregando H_3PO_4 0,1% (v/v) como solução transportadora, com taxa de fluxo da bomba a 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e temperatura a 32°C (MOREIRA et. al., 2017). O volume de amostra injetado foi de 20 μL de amostra previamente diluída (2 vezes para o hidrolisado e de 3 vezes para o fermentado). Padrões de D-glicose, D-xilose, celobiose, arabinose, ácidos orgânicos e inibidores (FF e HMF) foram utilizados na quantificação.

4.6. Fermentação alcoólica do hidrolisado

As fermentações foram realizadas utilizando *G. geotrichum* UFVJM-R150 como agente fermentativo. Esta linhagem, isolada de tomate em decomposição, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos, a partir da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM).

Foram analisados quatro diferentes tipos de substrato para determinar a melhor condição para produção de etanol por *G. geotrichum*: (1) solução modelo contendo 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de D-xilose, 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de D-glicose, 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de levedura, 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de peptona, 0,47 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 12,8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfato de potássio dibásico (KH_2PO_4), 0,51 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e 0,47 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (BARBOSA, 2017); (2) meio YPX (1% de extrato de levedura (m/v), 2% de peptona (m/v) e 2% de D-xilose (m/v)) e hidrolisados com 3 e 10% (m/v) de BT (3 e 4). Para

fins de comparação, hidrolisados com 3 e 10% BT (24 e 72 horas, respectivamente) foram também analisados para produção de etanol por *S. cerevisiae* (fermento comercial Fleischmann®).

Os processos fermentativos foram conduzidas em frascos do tipo erlenmeyer de 50 mL contendo 9 mL de hidrolisados ou de meios sintéticos/suplementados previamente autoclavados, seguido da adição de 1 mL de pré-inóculo (contendo densidade óptica de 1,0 DO) e incubou-se a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas, porém a 150 rpm para *G. geotrichum* UFVJM-R150 (VALINHAS, 2016; BARBOSA, 2017) e sem agitação para *S. cerevisiae*.

4.6.1. Manutenção de *G. geotrichum* UFVJM-R150

A linhagem *G. geotrichum* UFVJM-R150 foi mantida em meio líquido YPD (1% de extrato de levedura (m/v), 2% de peptona (m/v) e 2% de D-glicose (m/v)), adicionado de glicerol a 20% e congelada. A reativação foi realizada com uma alçada de repicagem, seguido de incubação em meio YPD líquido a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, sob agitação orbital a 150 rpm. Após o crescimento, uma alçada do pré-inóculo foi inoculada em meio YPD-ágar inclinado e incubada a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

4.6.2. Preparo do pré-inóculo

Para a obtenção do pré-inóculo, as seguintes condições foram avaliadas: um pré-inóculo com 1,0 DO a 600 nm no espectrofotômetro de UV-visível (BEL engineering) e outro submetido a crescimento por 24 horas. A levedura *G. geotrichum* UFVJM-R150 foi previamente crescida em meio líquido YPX, a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob agitação a 130 rpm até atingir 1,0 DO ou até completar 24 horas de incubação. Já *S. cerevisiae* foi previamente cultivada em meio líquido YPD, nas mesmas condições. Após o crescimento microbiano, os meios de cultura foram centrifugados a 2700 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes descartados. Os precipitados foram então ressuspensos em tubos falcons (50 mL) com 10 mL de água destilada.

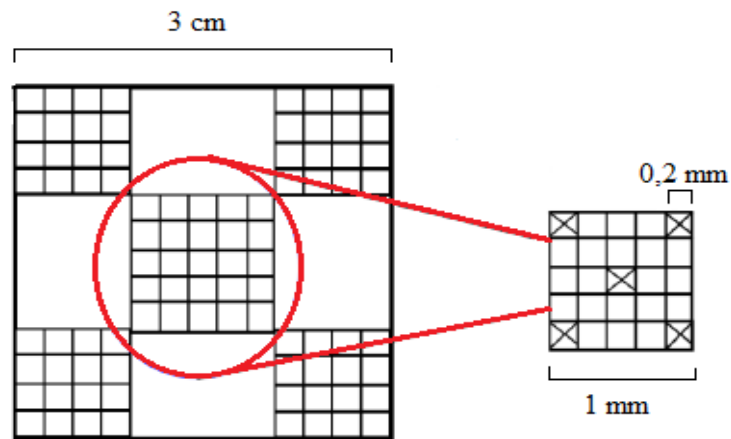
4.6.3. Monitoramento do processo fermentativo

A fermentação foi monitorada a cada 24 horas quanto à viabilidade celular (VC), o consumo de açúcares (g.L^{-1}), o teor de etanol (g.L^{-1}), o rendimento em etanol em função do substrato ($Y_{P/S}$) e a produtividade volumétrica (Q_p) (SILVA et. al., 2011; BRITO, 2016).

4.6.3.1. Viabilidade celular

A viabilidade celular (VC) foi avaliada empregando azul de metileno por contagem de células viáveis no microscópio óptico utilizando em câmara de Neubauer (Figura 14).

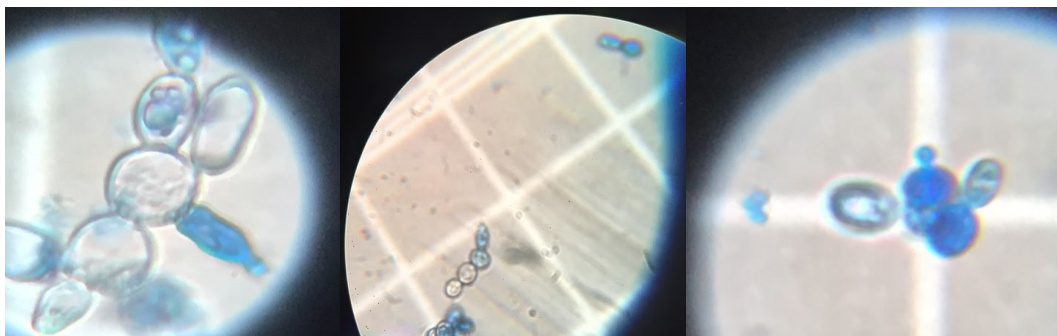
Figura 14 - Desenho esquemático da Câmara de Neubauer evidenciando a área de contagem.



Fonte: Modificado de Valinhas (2016).

Através da utilização do corante, as células viáveis se apresentam incolores, enquanto que as não viáveis ou mortas são coradas em azul (ALVES, 1998; VALINHAS, 2016).

Figura 15 – Imagem mostrando as células viáveis (incolores) e não viáveis (azuis) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Autora.

A contagem de VC foi expressa em número de células.mL⁻¹, segundo a equação 17:

$$VC(\text{células. mL}^{-1}) = \left(\frac{n \times fd}{0,004} \right) \times 1000 \quad \text{eq. (17)}$$

Onde:

n = Média de 5 contagens;

1000 = Fator de conversão de mm^3 para cm^3 ;

fd = Fator de diluição;

$0,004$ = Volume onde foi realizada a contagem;

4.6.3.2. Consumo de açúcares

Após a fermentação, os fermentados foram centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos e então analisados quanto ao consumo de D-glicose e D-xilose por CLAE, conforme descrito no tópico 4.5.4.

4.6.3.3. Quantificação da concentração de etanol por CLAE

As concentrações de etanol e ácidos orgânicos foram quantificadas por CLAE seguindo a metodologia descrita no tópico 4.5.4.

4.6.3.4. Determinação dos parâmetros da fermentação

Os fermentados foram analisados em relação ao rendimento em etanol ($Y_{P/S}$, $\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{açúcar}}^{-1}$), baseando-se na razão entre o etanol produzido e os açúcares consumidos. A produtividade volumétrica (Q_p , $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) foi estimada pela relação entre a concentração máxima de etanol e o seu correspondente tempo de fermentação (SILVA et. al., 2011; BRITO, 2016). Os parâmetros foram calculados de acordo com as equações 18 e 19:

$$Y_{\frac{P}{S}}(\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{açúcar}}^{-1}) = \frac{P}{\Delta S} = \frac{P}{S_i - S_f} \quad \text{eq. (18)}$$

Onde:

P = Concentração final de etanol ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$);

S_i e S_f = Concentração inicial e final de açúcar presente em ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

$$Q_p(\text{g.L}^{-1}) = \frac{P}{t} \quad \text{eq. (19)}$$

Onde:

P = Concentração final de etanol (g.L^{-1});

t = Tempo de fermentação (h).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização química do bagaço bruto (BB) e pré-tratado (BT)

A composição química do bagaço antes (BB) e após o pré-tratamento alcalino (BT) foi avaliada. As características investigadas foram: umidade (T_U), cinzas (T_C), lignina Klason total (L_{KT}) (soma das ligninas Klason insolúvel e solúvel), além dos teores de celulose ($T_{CEL.}$) e hemiceluloses ($T_{HEM.}$) (Tabela 1). Os teores descritos acima foram corrigidos pelo rendimento do pré-tratamento (BT_R) (73,48%), como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química do bagaço bruto (BB), bagaço tratado (BT) e bagaço tratado corrigido pelo rendimento (BT_R).

T_E	BB (%)	BT (%)	BT_R (%)	Rabelo (2007) ⁺	Ogata (2013) ⁺	Nascimento et.al. (2016) ⁺	Silva (2017) ⁺
T_U	9,53 ± 0,47	7,77 ± 0,08	5,70 ± 0,06	-	-	-	-
T_C	0,65 ± 0,01	0,22 ± 0,00	0,16 ± 0,00	-	-	3,8	2,14
L_{KT}	26,14 ± 0,51	14,90 ± 0,31	10,94 ± 0,23	25,8	-	21,7	24,22
$T_{CEL.}$	54,36 ± 3,31	75,05 ± 0,46	55,11 ± 0,34	39,6	54,18	38,8	42,77
$T_{HEM.}$	13,52 ± 4,49	12,78 ± 4,02	9,24 ± 3,05	19,7	-	29,4	27,61
B_M^*	104,17 ± 3,67	110,72 ± 2,17	75,74 ± 2,98	-	-	-	-

T_E = Teores;

* B_M = balanço de massa em base seca;

⁺= Valores de bagaço bruto.

Os teores de lignina, hemiceluloses e celulose presentes em BB (Tabela 1) estão dentro da faixa reportada na literatura para materiais lignocelulósicos, que varia de 40-50% de celulose, 20-40% de hemiceluloses e 20-30% de lignina (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016). O bagaço bruto (BB) apresentou 26,14% de lignina Klason total (Tabela 1). Valores próximos foram obtidos por Rabelo (2007), Nascimento et. al., (2016), e Silva, (2017), (25,8, 21,7 e 24,22 % respectivamente). Em relação ao teor de hemiceluloses em BB, observamos um valor inferior (13,52%) ao encontrado por outros autores como Teixeira et. al., (2000), Wolf (2011) e Silva (2017), que obtiveram 29,7, 29,4 e 27,61%, respectivamente. Rabelo (2007) e

Nascimento et. al., (2016) também observaram porcentagens superiores de hemiceluloses (19,7 e 29,4%, respectivamente). Com relação à celulose, observamos um total de 54,36% em BB (Tabela 1). Este valor encontra-se um pouco acima dos obtidos em estudos anteriores. Rabelo (2007), Nascimento et. al., (2016) e Silva, (2017) observaram 39,6, 38,8 e 42,77%, respectivamente. Ogata (2013) observou valores próximos de celulose em BB (54,18%) ao encontrado no presente trabalho. Em relação ao teor de cinzas, observou-se valores inferiores do que foi encontrado por Nascimento et. al., (2016) e Silva, (2017) que observaram 3,8 e 2,14%, respectivamente.

Os resultados obtidos na Tabela 1 podem ser justificados pela utilização de diferentes cultivares de bagaço de cana obtidos a partir de diferentes ambientes em cada estudo. Esses cultivares podem apresentar variabilidades genéticas, em função da região geográfica, clima, umidade, resultando em oscilações nas concentrações de cada componente (OGATA, 2013). Sabe-se que fatores edafoclimáticos (condições do solo e clima), variedade, maturação e sazonalidade, por exemplo, podem influenciar na composição química e/ou estrutural da cana-de-açúcar e, conseqüentemente, na composição do bagaço após a extração do xarope (STUPIELLO, 1987; SOUZA et. al., 2005; CARVALHO et. al., 2016; ANDRADE et. al., 2017).

Após a correção com o rendimento, observou-se uma redução de 58,15% na concentração de lignina no bagaço pré-tratado (BT). Este resultado indica uma remoção significativa dessa macromolécula após o pré-tratamento alcalino, que age na remoção de lignina por saponificação dos grupos ésteres (SILVA, 2017). Outros autores também obtiveram reduções significativas de lignina após pré-tratamento com NaOH. Maryana et. al., (2014) e Guilherme et. al., (2015) observaram uma redução de cerca de 50 e 75,77%, respectivamente, no conteúdo de lignina total no bagaço de cana pré-tratado com NaOH.

Após o pré-tratamento, observou-se um aumento na concentração de celulose, visto que a remoção de lignina ocasiona alterações na distribuição da concentração dos outros componentes, tornando BT mais rico em celulose. A diminuição no teor de lignina pode ainda contribuir para facilitar o acesso enzimático à fração celulósica no processo de hidrólise (KIM et. al., 2016; LAMOUNIER et. al., 2017). Observou-se ainda uma remoção de 31,66% das hemiceluloses em BT. Estes dados demonstram que o pré-tratamento alcalino foi eficiente tanto na retirada da lignina, quanto na conservação da celulose e de parte das hemiceluloses.

5.2. Quantificação de açúcares nos hidrolisados por ART e GOD-POD

A quantificação dos açúcares presentes nos hidrolisados foi realizada com o propósito de avaliar a eficiência da hidrólise em relação à porcentagem de substrato e tempo de hidrólise. As análises realizadas foram: dosagem de ART e de D-glicose livre e pentoses (Tabela 3).

Tabela 2 - Concentrações de ART, D-glicose e pentoses nos hidrolisados.

C_A (g.L ⁻¹)	HIDROLISADO 3% BT				HIDROLISADO 10% BT		
	24 horas	Huang et al. (2016)	Silva (2017)	72 horas	Silva (2017)	24 horas	72 horas
ART	43,25 ± 0,83	20,20	16,00	49,82 ± 0,28	23,05	71,00 ± 0,35	73,96 ± 0,36
D-glicose *	21,97 ± 0,97	-	-	22,54 ± 0,58	-	24,96 ± 0,13	27,35 ± 0,35
Pentoses**	21,28 ± 0,14	-	-	27,28 ± 0,86	-	46,04 ± 0,22	46,60 ± 0,72

C_A = Concentração de açúcares;

*Obtida pelo método de D-glicose oxidase (GOD-POD) descrita no tópico 4.5.2.

** Obtida pela diferença entre [ART] e [D-glicose] descrita no tópico 4.5.3.

A concentração máxima de ART (73,96 g.L⁻¹) foi obtida após a hidrólise utilizando 10% de BT, realizada por 72 horas, a 50°C e com 10 FPU de enzima por grama de celulose (Tabela 2). Quando comparamos os resultados com a literatura, observou-se que, em todas as hidrólises, a produção de ART foi bastante significativa (Tabela 2). No trabalho de Huang et. al., (2016), foram obtidos 20,20 g.L⁻¹ de ART após a hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com etóxido de sódio e utilizando dois coquetéis enzimáticos comerciais (Celluclast 1.5 L e Novozym 188) em uma razão de 1 FPU/4 ρNPGU por grama de celulose, a 45°C, por 72 horas e 3% de BT. Silva (2017) obteve aproximadamente 16,00 g.L⁻¹ de ART após hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com explosão a vapor e NaOH, utilizando 10 FPU.g⁻¹ de celulose de Cellic Ctec3 (Novozymes), a 50°C, por 24 horas e 3% de BT. Esse autor também realizou hidrólises do bagaço tratado por 72 horas nas mesmas condições, liberando 23,05 g.L⁻¹ de ART, indicando que o aumento no tempo de hidrólise favoreceu a liberação de ART. Dessa forma, concluiu-se que as concentrações de ART produzidas no presente trabalho após ambas as hidrólises enzimáticas com 3% de BT (tanto por 24 como por 72 horas) foram significativas (Tabela 2). Este resultado mostra ainda que, em termos de efeito de pré-tratamento na hidrólise, o pré-

tratamento alcalino foi mais eficiente que o processo por explosão a vapor, com a obtenção de concentrações de ART mais expressivas quando comparado ao estudo de Silva (2017).

Ao comparar todos os resultados, observou-se que a hidrólise com 10% de BT por 72 horas foi a mais eficiente na produção de ART, com uma concentração muito superior às encontradas após as demais condições (3% de BT por 24 e 72 horas e 10% de BT por 24 horas), indicando que o aumento da porcentagem de massa seca foi o fator que mais influenciou na hidrólise e no aumento da liberação dos açúcares (Tabela 2).

Em relação à quantificação de D-glicose nos hidrolisados pelo método da glicose oxidase (GOD-POD), observou-se valores próximos de D-glicose após todas as hidrólises (21,97, 22,54, 24,96 e 27,35 g.L⁻¹), sendo que a produção máxima foi também observada após a hidrólise com 10% de BT por 72 horas (Tabela 2). Esse resultado demonstrou que as concentrações de D-glicose livre e, conseqüentemente, de pentoses foram superiores no hidrolisado com 10% de BT após 72 horas, sugerindo-o como o material mais adequado para utilização nas fermentações tanto de C6 empregando *S. cerevisiae* como de C6/C5 com *G. geotrichum* UFVJM-R150 (Tabela 2). Estes dados corroboram os já apresentados para o teor de ART, indicando que a hidrólise com 10% de BT por 72 horas foi a mais eficiente, demonstrando que o aumento da porcentagem de massa seca e do tempo de hidrólise foram fatores cruciais na eficiência da hidrólise (Tabela 2).

5.3. Quantificação de açúcares presentes no hidrolisado por CLAE

Os açúcares e inibidores presentes nos hidrolisados foram quantificados por CLAE (Tabela 3).

Tabela 3 - Componentes encontrados nos hidrolisados após análise por CLAE.

<i>C</i> _{CLAE} (g.L ⁻¹)	HIDROLISADO 3% BT			HIDROLISADO 10% BT			
	24 horas	<i>Pereira et. al., (2016)</i>	72 horas	24 horas	72 horas	<i>Carli (2011)</i>	<i>Nascimento et. al., (2016)</i>
D-glicose	10,77±0,27	4,13	10,85±0,84	15,95±0,89	31,78±2,56	32,0	38,8
D-xilose	4,96±0,07	1,08	5,13±0,51	6,70±0,87	10,85±1,00	-	-
Celobiose	ND	-	0,11±0,08	1,62±0,31	1,68±1,13	-	-
Ác. cítrico	3,76±0,11	-	0,03±0,01	0,38±0,05	0,23±0,09	-	-
Furfural	ND	-	ND	ND	ND	-	-

5-HMF

ND

-

ND

ND

ND

-

-

C_{CLAE} = Componentes encontrados nos hidrolisados após análise por CLAE;

5-HMF = 5-Hidroximetilfurfural;

ND – Não detectado.

Na hidrólise com 3% de BT por 24 horas, obteve-se 10,77 e 4,96 g.L⁻¹ de D-glicose e D-xilose, respectivamente. Esses valores foram superiores aos encontrados por Pereira et. al., (2016), utilizando um combinado de enzimas comerciais (Celluclast 1.5 L e Novozym 188, em uma razão de 10 FPU e 30 CBU por grama de celulose), após hidrólise com 3% de bagaço de cana pré-tratado por ozonólise, nas mesmas condições de temperatura e tempo (4,13 e 1,08 g.L⁻¹ de D-glicose e D-xilose, respectivamente). A mesma autora ainda utilizou extrato enzimático do fungo (*Myceliophthora thermophila* JCP 1-4), após hidrólise com 3% de bagaço de cana pré-tratado por ozonólise, nas mesmas condições de temperatura e tempo (4,19 e 1,94 g.L⁻¹ de D-glicose e D-xilose, respectivamente).

Comparando-se os dados obtidos após a hidrólise por 72 horas utilizando 10% de BT, conforme a literatura, observou-se que os resultados foram semelhantes aos descritos em alguns estudos. Nascimento et. al., (2016) realizaram hidrólise enzimática com 10% de BT pré-tratado com NaOH também a 50°C e por 72 horas, porém, utilizando 20 FPU.g⁻¹ de celulose da enzima Accelerase 1500 e obtiveram 38,8 g.L⁻¹ de D-glicose no hidrolisado. Este resultado foi ligeiramente superior ao encontrado no presente trabalho (31,78 g.L⁻¹ de D-glicose). No entanto, esses autores utilizaram o dobro da carga enzimática (20 FPU.g⁻¹). Desta forma, o resultado alcançado neste estudo é bastante satisfatório, visto que mesmo utilizando uma concentração enzimática inferior (10 FPU.g⁻¹celulose) foi possível obter uma quantidade de D-glicose muito significativa (Tabela 3). Carli (2011) realizou uma hidrólise enzimática com 10% de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, hidróxido de amônio (NH₄OH) e NaOH a 50°C durante 35 horas, utilizando 65 FPU.g⁻¹ de celulose da enzima Accelerase 1500 e obteve 32 g.L⁻¹ de D-glicose. Este resultado foi muito próximo ao encontrado no presente estudo, o que indica que os resultados obtidos são bastante expressivos, visto que uma quantidade de enzimas muito inferior foi utilizada (10 FPU.g⁻¹).

Os dados obtidos demonstraram ainda que as concentrações de D-glicose e D-xilose no hidrolisado com 10% de BT de 72 horas foram superiores às encontradas após as demais hidrólises (Tabela 3). Tais resultados também podem ser explicados pelo aumento da porcentagem de massa seca, sendo que este foi o principal fator da hidrólise que ocasionou o

aumento na eficiência da liberação dos açúcares. Andrade et. al., (2017) demonstraram que alterações simultâneas em parâmetros importantes na hidrólise enzimática, como tempo e método de pré-tratamento, bem como sólidos totais, influenciam diretamente no rendimento final do processo. Além disso, a presença dos inibidores HMF e FF não foi detectada nos hidrolisados. Em função da alta concentração de açúcares e ausência de inibidores, hidrolisados de 10% (72 horas) foram submetidos à fermentação alcoólica. Para fins comparativos, hidrolisados com 3% de BT de 24 horas também foram avaliados.

5.4. Fermentação alcoólica

5.4.1. Viabilidade celular

As Figuras 16 e 17 apresentam os dados obtidos para viabilidade celular (VC). A VC máxima foi observada na fermentação realizada com hidrolisado de 10% de BT (72 horas), tanto para *G. geotrichum* UFVJM-R150 quanto para *S. cerevisiae* ($9,3 \times 10^9$ e $5,35 \times 10^9$ células.mL⁻¹, respectivamente).

Figura 16 - Viabilidade celular de *G. geotrichum* UFVJM-R150, durante a fermentação com diferentes substratos.

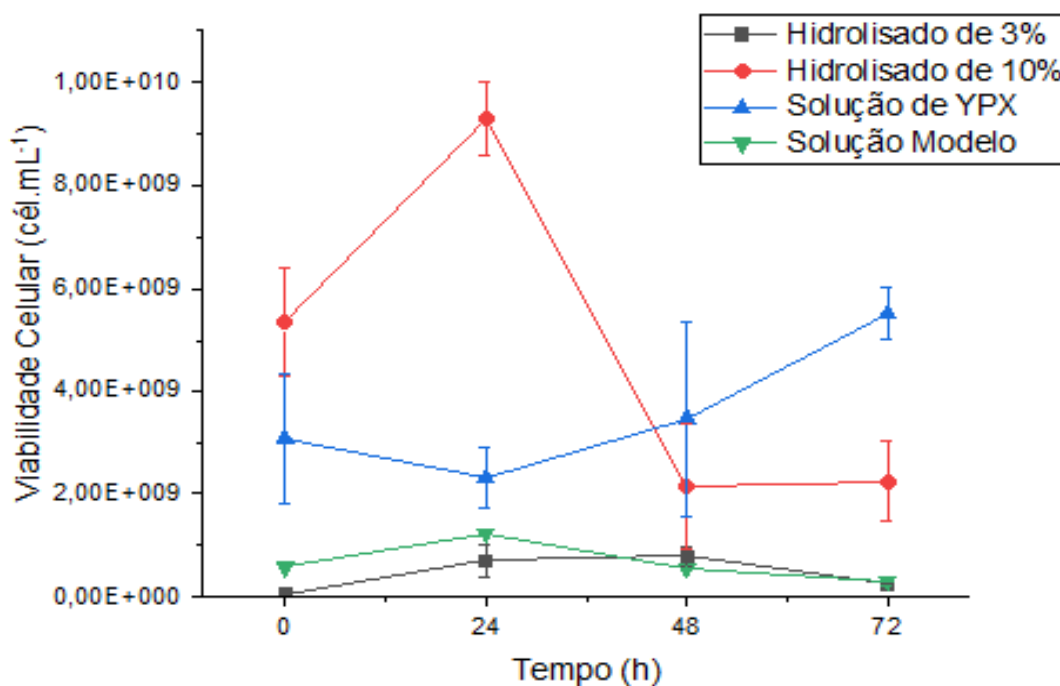
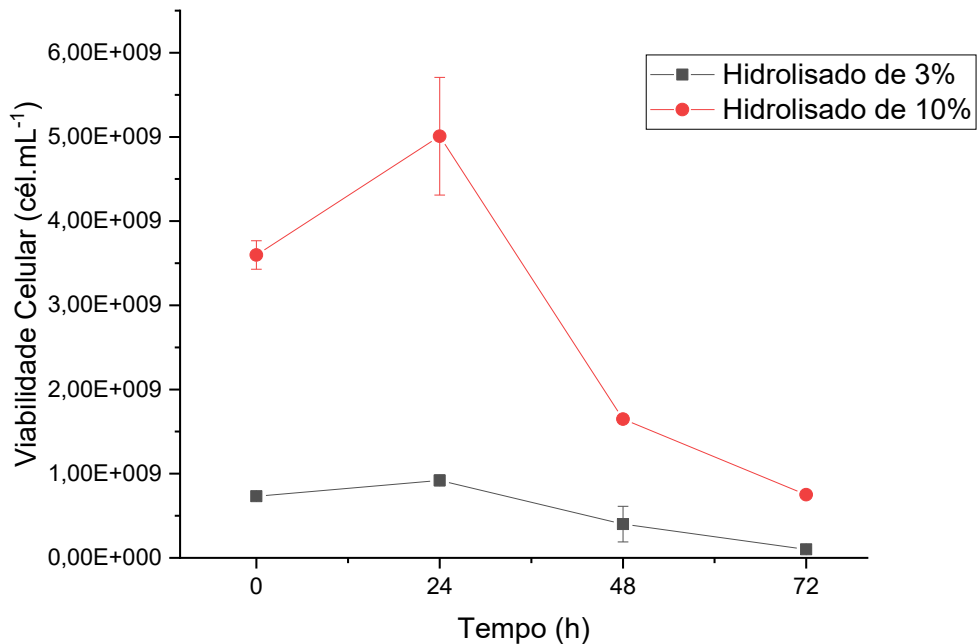


Figura 17 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae*, durante a fermentação com hidrolisados a 3 (24 horas) e 10% (72 horas).



Realizou-se ainda uma fermentação com *G. geotrichum*UFVJM-R150 utilizando a mesma solução modelo descrita por Barbosa (2017) e comparou-se o resultado obtido por este autor com os realizados no presente trabalho (Figura 16). Verificou-se que o crescimento celular utilizando a solução modelo foi inferior ao alcançado, tanto na fermentação utilizando hidrolisado com 10% de BT (72 horas) quanto no meio YPX, sendo levemente superior somente à fermentação do hidrolisado com 3% de BT (24 horas). Este resultado pode ser justificado pelo fato de que no hidrolisado com 3% de BT, a quantidade de açúcares no meio foi relativamente baixa (Tabela 4). Portanto, a fermentação com hidrolisado com 10% de BT (72 horas) foi selecionada como a melhor condição para viabilidade celular (Figura 17).

Após selecionar a melhor fonte de substrato para o crescimento das leveduras (hidrolisado com 10% de BT de 72 horas), foram realizados experimentos para avaliar o melhor pré-inóculo para a fermentação. Nestes testes, foram realizadas fermentações utilizando pré-inóculo de 24 horas e com 1,0 DO de turbidez para avaliar VC, sendo que os hidrolisados foram suplementos com a solução modelo; porém, sem as fontes de carbono (D-glicose e D-xilose). Como mostrado nas Figuras 18 e 19, cada levedura apresentou um comportamento diferente. *G. geotrichum* UFVJM-R150 demonstrou melhor crescimento utilizando um pré-inóculo contendo densidade óptica de 1,0 DO ($1,23 \times 10^{10}$ células.mL⁻¹), enquanto que *S. cerevisiae* apresentou VC maior quando o pré-inóculo de 24 horas foi utilizado ($7,76 \times 10^9$ células.mL⁻¹).

Figura 18 - Otimização do pré-inóculo para *G. geotrichum* UFVJM-R150 com hidrolisados suplementados.

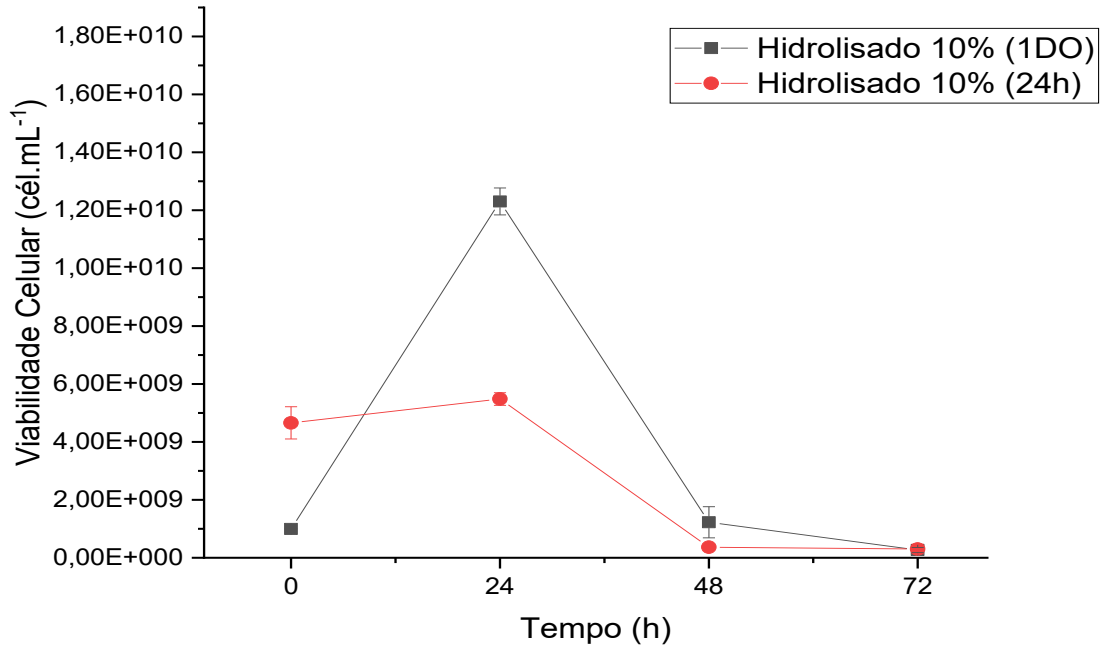
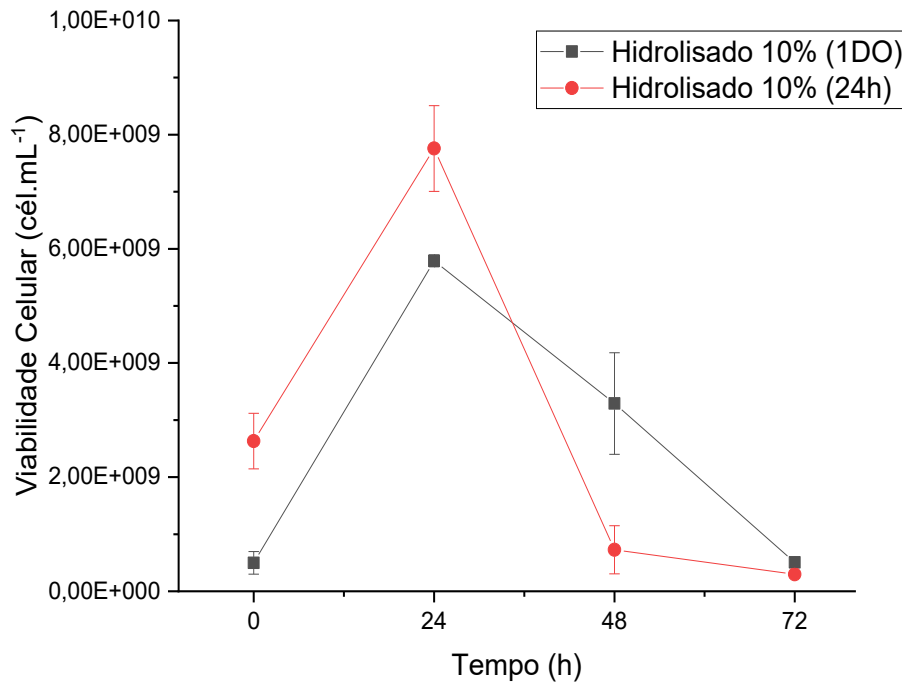


Figura 19 - Otimização do pré-inóculo para *S. cerevisiae* com hidrolisados suplementados.



Os resultados obtidos nesta etapa foram superiores aos encontrados no experimento realizado sem a suplementação dos hidrolisados (Figuras 16 e 17).

5.4.2. Produção de etanol e outros compostos

As concentrações de etanol e outros compostos produzidos nos fermentados foram quantificadas por CLAE (Tabela 4).

Tabela 4 - Compostos encontrados após fermentações empregando *S. cerevisiae*.

COMPOSTOS (g.L ⁻¹)	HIDROLISADO 3%		HIDROLISADO 10%
	24 horas	72 horas	Pereira et al. (2016)
Etanol	1,42 ± 0,24	16,15 ± 0,00	-
Ácido acético	0,20 ± 0,00	0,65 ± 0,04	-
Ácido galacturônico	ND	0,98 ± 0,18	3,15

ND – Não detectado.

S. cerevisiae produziu alta concentração de etanol (16,15 g.L⁻¹) nas fermentações realizadas com hidrolisado contendo 10% de BT com 72 horas de hidrólise (Tabela 4). O valor obtido de etanol foi bastante expressivo quando comparado a outros trabalhos na literatura. Pereira et. al., (2016) obtiveram 3,15 g.L⁻¹ de etanol após fermentação com *S. cerevisiae* de hidrolisado contendo 10% de BC pré-tratado por ozonólise, submetido à hidrólise com 10 FPU/30CBU de Celluclast 1.5 L e Novozym 188, por 48 horas. Santos et. al., (2010) fermentaram hidrolisado contendo 12% de BC deslignificado com NaOH, submetido à hidrólise com 30 FPU.g⁻¹ e 20 CBU.g⁻¹ de bagaço (Celluclast e Novozym 188) a 50°C, durante 72 horas e obtiveram produtividade máxima (Q_P) de 0,25 g.L⁻¹.h⁻¹, enquanto que no presente trabalho foi obtido Q_P de 0,67 g.L⁻¹.h⁻¹.

Outros compostos foram produzidos em quantidades insignificantes, tais como o ácido acético e ácido galacturônico (Tabela 4). O ácido acético foi encontrado em concentrações muito baixas, o que pode indicar que os efeitos tóxicos que este composto poderia causar às leveduras, tais como a redução do crescimento e a inibição da fermentação (WHITING et. al., 1976; RODRIGUES, 2017), não influenciaram no crescimento celular e na produção de etanol.

As análises em relação à produção de etanol e outros compostos presentes nos fermentados também foram realizadas para a levedura *G. geotrichum* UFVJM-R150 (Tabela 5).

Tabela 5 - Compostos encontrados após fermentações empregando *G. geotrichum* UFVJM-R150.

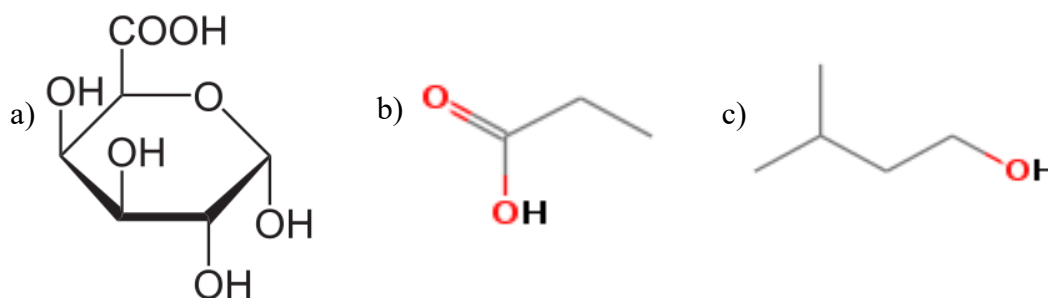
COMPOSTOS	HIDROLISADO (g.L ⁻¹)		SOLUÇÕES SINTÉTICAS (g.L ⁻¹)	
	3 %	10%	YPX	SOLUÇÃO MODELO
	24 horas	72 horas		
Etanol	ND	9,99 ± 0,00	0,86 ± 0,02	0,12 ± 0,00
Álcool isoamílico	ND	7,64 ± 0,00	7,88 ± 0,79	7,53 ± 0,68
Ácido propiônico	ND	1,41 ± 0,00	8,98 ± 0,00	11,22 ± 0,89
Ácido galacturônico	ND	1,76 ± 0,08	1,02 ± 0,00	6,15 ± 3,68
Ácido acético	ND	0,46 ± 0,11	0,66 ± 0,06	0,56 ± 0,15

ND – Não detectado;

G. geotrichum UFVJM-R150 também produziu outros metabólitos em menores concentrações (ácido galacturônico, ácido propiônico, álcool isoamílico) na fermentação do hidrolisado com 10% de BT por 72 horas. Esses compostos possuem diversas aplicações na indústria (YOKOI et. al., 2002; WANG et al., 2017). Nas fermentações com meio YPX, ácido propiônico e álcool isoamílico foram os subprodutos encontrados em maior concentração (Tabela 5), com produção máxima de álcool isoamílico (7,88 g.L⁻¹). Já na fermentação utilizando a solução modelo, foram encontrados 11,22 e 6,15 g.L⁻¹ de ácido propiônico e galacturônico, respectivamente, sendo estas as maiores concentrações obtidas para estes compostos. Por outro lado, foi observado ainda que, em ambas as fermentações foram obtidas as menores concentrações de etanol (0,86 e 0,12 g.L⁻¹), sugerindo que tais condições são mais indicadas para a produção de compostos secundários (Tabela 5). Portanto, com base nesses dados, conclui-se que a fermentação empregando o hidrolisado contendo 10% de BT (72 horas de hidrólise) foi a mais adequada para a produção de etanol 2G, com produção muito significativa (9,99 g.L⁻¹).

Estes resultados sugerem que, além da produção de etanol, *G. geotrichum* UFVJM-R150 pode ser também utilizada em biorrefinarias. Biorrefinarias são refinarias onde vários produtos de interesse industrial podem ser obtidos a partir de uma matéria prima renovável (ALVIM et. al., 2014). Como exemplo, pode-se citar uma usina sucroalcooleira, cujo produto principal seria o etanol e produtos secundários seriam os descritos acima. A Figura 20 apresenta as estruturas das moléculas de ácido galacturônico, ácido propiônico e álcool isoamílico.

Figura 20 - Representação esquemática das moléculas de a) ácido galacturônico, b) ácido propiônico, c) álcool isoamílico.



Fonte: NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY.

O ácido galacturônico (Figura 20 a) podem ser utilizados na indústria de alimentos (como agentes ácidos), na indústria química (como sabão em pó e surfactante biodegradável não iônico ou aniônico) e na indústria farmacêutica (para produção de vitamina C) (KERTESZ, 1951; MOLNÁR et. al., 2008).

O ácido propiônico (PA) (Figura 20 b) pode ser utilizado como conservante e intermediário químico nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e herbicidas. Atualmente, o PA é predominantemente produzido a partir de fontes fósseis em escala industrial. A produção biológica de PA por bactérias do gênero *Propionibacterium*, incluindo *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii* e *P. shermanii* a partir de uma ampla diversidade de fontes de carbono foi descrita recentemente (WANG et. al., 2017). A produção por *Veillonella*, *Clostridium* e *Selenomonas* também foi descrita (SESHADRI e MUKHOPADHYAY, 1993; BOYAVAL et. al., 1994; MELO, 2007). No entanto, este é o primeiro relato da produção deste composto por leveduras.

O álcool isoamílico (Figura 20 c) possui potencial aplicação como biocombustível, além de ser utilizado como solvente para reações químicas, extrações líquidas e como material de partida para a síntese do éster de sabor acetato de isoamila (VOGT et. al., 2016). As leveduras *S. cerevisiae* M-300-A, *S. uvarum* IZ-1094 e a *S. cerevisiae* (Fleischmann®) foram descritas no trabalho de Gutierrez, (1993) como produtoras de álcool isoamílico. As espécies de leveduras *Fermentis safagler* W-34/70, *F. safbrew* S-33, *Kluyveromyces lactis* GG799, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* KM71H, GS115 e X33, também foram descritas como produtoras de álcool isoamílico (AZAH et. al., 2014)

As taxas de produtividade em etanol ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica (Q_P), e a produção de etanol para *G. geotrichum* UFVJM-R150 e *S. cerevisiae* nas diferentes condições de fermentação são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Taxas de rendimento em etanol e produtividade volumétrica.

<i>LEVEDURAS</i>	<i>Meio de fermentação</i>	<i>Etanol (g.L⁻¹)</i>	<i>Y_{P/S} (g_{etanol}.g_{açúcar}⁻¹)</i>	<i>Q_P (g.L⁻¹.h⁻¹)</i>
	YPX	0,86 ± 0,02	0,35	0,04
<i>G. geotrichum</i>	Sol. Modelo	0,12 ± 0,00	0,00	0,01
<i>UFVJM-R150</i>	H 3% 24 horas	0,00 ± 0,00	0,00	0,00
	H 10% 72 horas	9,99 ± 0,00	0,27	0,42
<i>S. cerevisiae</i>	H 3% 24 horas	1,42 ± 0,24	0,15	0,06
	H 10% 72 horas	16,15 ± 0,00	0,48	0,67

H: hidrolisado.

Comparando a produção de etanol por *G. geotrichum* UFVJM-R150 utilizando a solução modelo conforme a literatura, observou-se que esta produção foi de apenas 0,12 g.L⁻¹ (Tabela 6). Barbosa (2017), em seu trabalho realizado com fermentação de *G. geotrichum* UFVJM-R150 também com a solução modelo, obteve uma produção superior (5,78 g.L⁻¹ de etanol, Q_P de 0,05 g.L⁻¹.h⁻¹ e $Y_{P/S}$ de 0,17 g_{etanol}.g_{açúcar}⁻¹). Valinhas (2016), utilizando um meio sintético, obteve 9,2 g.L⁻¹ de etanol, Q_P de 0,13 g.L⁻¹.h⁻¹ e $Y_{P/S}$ de 0,22 g_{etanol}.g_{açúcar}⁻¹. Como até o momento não foram encontrados na literatura estudos descrevendo fermentações de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *G. geotrichum* UFVJM-R150 como inóculo (somente com meios sintéticos), comparamos os resultados obtidos com o estudo de Barbosa (2017) que também utilizou a solução modelo, porém, com concentrações de fontes de carbono diferentes (35 g.L⁻¹ de D-glicose e 20 g.L⁻¹ de D-xilose). Dessa forma, o resultado que mais se assemelhou foi a fermentação utilizando o hidrolisado com 10% de BT (9,99 g.L⁻¹ de etanol, Q_P de 0,42g.L⁻¹.h⁻¹ e $Y_{P/S}$ de 0,27g_{etanol}.g_{açúcar}⁻¹), visto que este continha 31,78 de D-glicose e 10,85 g.L⁻¹ de D-xilose, respectivamente. Estes dados sugerem que os resultados do presente trabalho são superiores aos encontrados até o momento na literatura (Tabela 6).

As diferentes concentrações de açúcares nos hidrolisados e fermentados, e seus respectivos consumos dos açúcares (%) dos hidrolisados após a fermentação alcoólica utilizando *G. geotrichum* UFVJM-R150 estão contidas na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentração (g.L^{-1}) e consumo de açúcares (%) antes e após a fermentação alcoólica utilizando *G. geotrichum* UFVJM-R150 e da *S. cerevisiae*.

<i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R150						
Açúcares	H.3% 24 horas	Fermentado	Consumo	H.10% 72 horas	Fermentado	Consumo
	(g.L^{-1}) [#]	(g.L^{-1}) [*]	(%)	(g.L^{-1})	(g.L^{-1}) [*]	(%)
D-glicose	9,88±0,24	8,47±0,32	15,13	28,60±2,30	5,85±0,53	79,55
D-xilose	4,62 ± 0,06	4,42 ± 0,26	4,45	9,88±0,90	5,91±0,37	40,19
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						
Açúcares	H.3% 24 horas	Fermentado	Consumo	H.10% 72 horas	Fermentado	Consumo
	(g.L^{-1}) [#]	(g.L^{-1}) [*]	(%)	(g.L^{-1})	(g.L^{-1}) [*]	(%)
D-glicose	9,88±0,24	1,91±0,73	80,62	28,60±2,30	0,01±0,17	99,96
D-xilose	4,62 ± 0,06	4,60± 0,04	0,56	9,88±0,90	9,85±0,66	0,30

H: Hidrolisado;

*[Açúcar] residual após a fermentação;

[#] As concentrações de açúcares presentes no hidrolisado referem-se ao tempo inicial da fermentação após uma diluição do hidrolisado com adição de 10% de inóculo (v/v).

Dessa forma, os resultados sugerem que *G. geotrichum* UFVJM-R150 foi capaz de fermentar tanto D-glicose quanto D-xilose. Observou-se ainda que, o consumo de ambos os açúcares foi maior no hidrolisado contendo 10% de BT (72 horas de hidrólise), com cerca de 79,55% de consumo de D-glicose e da D-xilose de 40,19% (Tabela 7), demonstrando também sua habilidade em fermentar pentoses. Barbosa (2017) observou um consumo de D-xilose por esta espécie próximo ao observado no presente estudo (54,67%).

Os dados da Tabela 7 ainda indicam que a levedura *S. cerevisiae* foi capaz de fermentar D-glicose, como descrito na literatura. Observou-se ainda que, o consumo da D-glicose foi maior no hidrolisado contendo 10% de BT (72 horas de hidrólise), com cerca de 99,96% de consumo de D-glicose (Tabela 7), ainda se observou que o consumo de D-glicose também foi satisfatório no hidrolisado contendo 3% de BT (24 horas de hidrólise), com cerca de 80,62% de consumo de D-glicose.

6. CONCLUSÕES

Após o pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar, observou-se uma remoção de 31,66% das hemiceluloses, além de uma redução significativa no teor de lignina (58,15%) no bagaço pré-tratado (BT). Observou-se ainda uma manutenção quase total da celulose, visto que a diminuição no teor de lignina ocasionou a redistribuição na concentração dos outros componentes. Estes dados demonstram que o pré-tratamento alcalino foi eficiente tanto na remoção da lignina, quanto na manutenção da celulose e de parte das hemiceluloses, contribuindo positivamente para etapa seguinte de hidrólise.

As maiores concentrações de D-glicose (31,78 g.L⁻¹) e D-xilose (10,85 g.L⁻¹) foram obtidas no hidrolisado com 10% de BT de 72 horas, demonstrando que o aumento da porcentagem de massa seca influenciou positivamente a hidrólise, resultando no aumento da liberação de açúcares. Além disso, a presença dos inibidores HMF e FF não foi detectada em nenhuma amostra de hidrolisados.

A produção máxima de etanol foi observada nas fermentações do hidrolisado contendo 10% de BT (72 horas de hidrólise), sendo 9,99 g.L⁻¹ por *G. geotrichum* UFVJM-R150 e 16,15 g.L⁻¹ por *S. cerevisiae*. Os valores máximos de rendimentos $Y_{P/S}$ e Q_p para *G. geotrichum* UFVJM-R150 foram de 0,27 g_{etanol}.g_{açúcar}⁻¹ e 0,42 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente. Para *S. cerevisiae*, $Y_{P/S}$ e Q_p foram 0,48 g_{etanol}.g_{açúcar}⁻¹ e 0,67 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente.

Observou-se ainda que *G. geotrichum* UFVJM-R150 produziu outros produtos de valor agregado além de etanol, tais como o ácido galacturônico, o ácido propiônico e o álcool isoamílico nas fermentações utilizando hidrolisado de 10% de BT (72 horas), YPX e solução modelo. Essa produção de metabólitos secundários pode viabilizar a utilização desta levedura em biorrefinarias.

Os valores de rendimento, produtividade em etanol e consumo de C6 e de C5 foram satisfatórios para *G. geotrichum* UFVJM-R150, sendo que, até o momento, não existem estudos na literatura que demonstram a sua utilização em fermentações alcoólicas de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, Héricles Resende Ricardo De. **Produção de etanol de segunda geração**. 2017. 85 f. Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

ALVIM, J C et. al. Biorrefinarias: Conceitos, classificação, matérias primas e produtos. *Journal of Bioenergy and Food Science. Macapá*, v. 013, n. 3, p. 61–7761, 2014.
<http://periodicos.ifap.edu.br/index.php/JBFS>

ALVIRA, P. et. al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>

AMORIM, Henrique V. et. al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3437-6>

AZAH, R N; ROSHANIDA, A R; NORZITA, N. Production of 3-methyl-1-butanol by yeast wild. *International Journal of Biotechnonlogy and Bioengineering*, v. 8, n. 4, p. 412–415, 2014.

BARBOSA, Gabriela Maria Pereira. **Avaliação do potencial de leveduras selvagens para a fermentação alcoólica de D-xilose**. 2017. 87 f. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2017.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 8, p. 353–368, 1992.
<https://doi.org/10.1007/BF01198746>

BEZERRA, Tais Lacerda; RAGAUSKAS, Art J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 10, n. 5, p. 634–647, 2016. <https://doi.org/10.1002/bbb.1662>

BRAGATTO, Juliano. **Avaliação do potencial da casca de Eucalyptus spp. para a**

produção de bioetanol. 2010. 154 f. Universidade de São Paulo, 2010.

BROWING, B. L. Chemical physics of ionic solutions. WILEY (Org.). . Methods of Wood Chemistry. New York: [s.n.], 1967. v. 2. p. 498.

CARLY, Chanel Moacyr De. **Hidrólise e fermentação do bagaço de cana de açúcar em escala de bancada para produção de etanol de 2G.** 2011. 81 f. Universidade Federal de São Carlos, 2011.

CHANDRA, R. P. et. al. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 108, n. May, p. 67–93, 2007. https://doi.org/10.1007/10_2007_064

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira (Cana-de- açúcar).** Brasília: [s.n.], 2018. <http://www.conab.gov.br>

COSTA NETO, Pedro R. et. al. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 531–537, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000400017>

CRIVELLARI, Augusto Cesar. **Caracterização estrutural das hemiceluloses de paredes celulares de cana-de-açúcar.** 2012. 93 f. Universidade de São Paulo, 2012.

DIAS, Lídia Manfrim. **Produção de celulasas e hemicelulasas por *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* utilizando sorgo biomassa como principal fonte de carbono.** 2017. 87 f. Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

DOS SANTOS, Leandro Vieira et. al. Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. *Industrial Biotechnology*, v. 12, n. 1, p. 40–57, 2016. <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ind.2015.0017>

FUGITA, Tatiane Passa Lozano. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.** 2010. 60 f. Universidade Estadual Paulista, 2010.

GARCIA, Daniella dos Reis. **Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior.** 2009. 101 f. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

GUILHERME, A. A. et. al. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 32, n. 1, p. 23–33, 2015. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20150321s00003146>

GURGEL, Leandro Vinícius Alves. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol.** 2010. 315 f. Universidade de São Paulo, 2010.

GUTIERREZ, Luiz Eduardo. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. *Scientia Agricola*, v. 50, n. 1965, p. 464–472, 1993.

HAHN-HÄGERDAL, B. et. al. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 549–556, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.10.004>

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

KIM, Jun Seok; LEE, Y. Y.; KIM, Tae Hyun. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 42–48, 2016. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>

LAMOUNIER, K.F.R. et. al. Saccharification of sugarcane bagasse using an enzymatic extract produced by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Renewable Materials*, v. 6, n. 2, p. 1–7, 2017.

LELLIS, André Teixeira. **Aplicação de extratos enzimáticos fúngicos na ensilagem do milho**. 2012. 62 f. Universidade Estadual Paulista, 2012.

MACHADO, Daniel Longo. **Estudo da adsorção das enzimas do complexo celulolítico em bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos e avicel**. 2013. 153 f. Universidade Estadual de Campinas, 2013.

MARQUES, Natália Paganini. **Otimização da produção de celulases pelo cultivo isolado e co-cultivo de fungos endofíticos e aplicação das enzimas na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. 2017. 150 f. Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

MARYANA, Roni et. al. Alkaline pretreatment on sugarcane bagasse for bioethanol production. *Energy Procedia*, v. 47, p. 250–254, 2014.
<http://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.01.221>

MATEO, Soledad et. al. Ethanol and xylitol production by fermentation of acid hydrolysate from olive pruning with *Candida tropicalis* NBRC 0618. *Bioresource Technology*, v. 190, p. 1–6, 2015. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.045>

MATOS, Jéssica Pereira De et. al. Fermentação alcoólica de hidrolisado hemicelulósico de torta de girassol por *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 e *Candida akabanensis* UFVJM-R131. v. 41, n. 1, p. 23–29, 2018.

MENG, Xianzhi; RAGAUSKAS, Arthur Jonas. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 27, p. 150–158, 2014. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.014>

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
<https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

MOLNÁR, E.; NEMESTÓTHY, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K. Galacturonic acid recovery from pectin rich agro-wastes by electrodialysis with bipolar membranes. *Hungarian Journal of Industrial Chemistry*, v. 36, n. 1, p. 95–99, 2008.

MOREIRA, F. S. et. al. Improvement of hydrogen production by biological route using repeated batch cycles. *Process Biochemistry*, v. 58, p. 60–68, 2017.

<http://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.013>

NASCIMENTO, Viviane Marcos et. al. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. *Bioethanol*, v. 2, n. 1, p. 112–125, 2016.

<https://www.degruyter.com/view/j/bioeth.2015.2.issue-1/bioeth-2016-0008/bioeth-2016-0008.xml>

NELSON, David L; COX, Michael M. Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition. Lehninger Principles of Biochemistry. Fourth ed. [S.l: s.n.], 2004. p. 51.

OGATA, Bruna Harumi. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. 2013. 109 f. Universidade de São Paulo, 2013.

OLIVEIRA, Christiane Curiel dos Santos De. **Otimização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino a alta concentração de sólidos para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 96 f. Universidade Estadual de Campinas, 2012.

PANDEY, Ashok; SOCCOL, Carlos R; MITCHELL, David. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, Jul 2000. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)

PEREIRA, Douglas Gualberto Sales. **Rendimentos da hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon, capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. 2013. 52 f. Universidade Federal De Viçosa, 2013.

PEREIRA, Josiani de Cassia et. al. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 204, p. 122–129, 2016.

PETROU, Evangelos C.; PAPPIS, Costas P. Biofuels: a survey on pros and cons. *Energy and*

Fuels, v. 23, n. 2, p. 1055–1066, 2009. <https://doi.org/10.1021/ef800806g>

PHILIPPINI, Rafael Rodrigues. **Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas**. 2012. 82 f. Universidade de São Paulo, 2012.

RABELO, S. C. et. al. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, n. 7, p. 2600–2607, 2011. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.042>

RABELO, Sarita Cândido. **Avaliação de desempenho de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 180 f. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

RABEMANOLONTSOA, Harifara; SAKA, Shiro. Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource Technology*, v. 199, n. August, p. 83–91, 2016. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.029>

RODRIGUES, Patrícia de Oliveira. **Ação sinérgica de celulases e hemicelulases fúngicas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino**. 2016. 77 f. Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

RODRIGUES, Patrícia de Oliveira et. al. Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-) cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. *Industrial Crops and Products*, v. 109, n. September, p. 173–181, 2017.

RODRIGUES, Romaira Guedes. **Diversidade microbiana cultivável em processo industrial de produção de etanol**. 2017. 78 f. Universidade de Brasília, 2017.

SANTOS, Julliana Ribeiro Alves Dos et. al. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. *Química nova*, v. 33, n. 4, p. 904–908, 2010.

SILVA, Caio Oliveira de Gorgulho. ***Emericella nidulans* e bagaço de cana-de-açúcar**:

ferramentas para produção de endo- β -1,4- xilanase. 2014. 111 f. Universidade de Brasília, 2014.

SILVA, Rosimeire Oenning Da. **Bioprospecção de leveduras fermentadoras de xilose visando a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar.** 2015. 134 f. Universidade Estadual Paulista, 2015.

SILVA, Thiago Alves Lopes. **Avaliação do pré-tratamento de explosão a vapor catalisado por ácido cítrico e hidróxido de sódio sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.** 2017. 69 f. Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

SOUSA, Vitor Magalini Zago De. **Desenvolvimento de novas metodologias para o pré-tratamento e hidrólise do bagaço de cana para a produção de etanol celulósico.** 2014. 56 f. Universidade de Brasília, 2014.

SU, Chia Hung et. al. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass in ionic liquid media for fermentable sugar production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 43, n. 4, p. 573–577, 2012. <http://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.02.001>

SUN, Ye; CHENG, Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, v. 83, n. 1, p. 1–11, Mai 2002. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)

TAHERZADEH, Mohammad J.; KARIMI, Keikhosro. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 9, n. 9, p. 1621–1651, 1 Set 2008. <http://www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621>

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. De O. Agro-industrial residues in biotechnological production of xylitol. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 25, n. 4, p. 315–330, 2004. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2004v25n4p315>

TEIXEIRA, Lincoln C.; LINDEN, James C.; SCHROEDER, Herbert A. Simultaneous saccharification and cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, p. 111–127, 2000.

VALINHAS, Raquel Valinhas e. **Isolamento, seleção e identificação de leveduras selvagens com capacidade para conversão de xilose a etanol.** 2016. 87 f. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2016.

VIEIRA, Carla Ferreira dos Santos. **Seleção e melhoramento de leveduras capazes de fermentar pentoses através de engenharia evolutiva.** 2016. 111 f. Universidade Estadual De Campinas, 2016.

VOGT, Michael et. al. Production of 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol in engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*, v. 38, p. 436–445, 2016. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.007>

WANG, Xiaoqing et. al. Propionic acid production from corn stover hydrolysate by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 10, n. 1, p. 200, 2017. <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-017-0884-z>

WOLF, Lúcia Daniela. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-aúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros.** 2011. 147 f. Universidade Federal de São Carlos, 2011.