



UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



ANDRESSA MOREIRA DO NASCIMENTO

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM HIDRÓXIDO DE AMÔNIO NA
SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E SABUGO DE MILHO E
PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

UBERLÂNDIA – MG

2025

ANDRESSA MOREIRA DO NASCIMENTO

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM HIDRÓXIDO DE AMÔNIO NA
SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E SABUGO DE MILHO E
PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia.

Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos aplicados à conversão de biomassas a biocombustíveis.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Milla Alves Baffi
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Pasquini

UBERLÂNDIA – MG

2025



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biocombustíveis				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 055, PPBGBIOCOM				
Data:	16 de julho de 2025	Hora de início:	08:30	Hora de encerramento:	11:30
Matrícula do Discente:	12322PGB002				
Nome do Discente:	Andressa Moreira do Nascimento				
Título do Trabalho:	EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM HIDRÓXIDO DE AMÔNIO NA SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E SABUGO DE MILHO E PRODUÇÃO DE ETANOL 2G				
Área de concentração:	Biocombustíveis				
Linha de pesquisa:	Processos químicos e bioquímicos aplicados à conversão de biomassas a biocombustíveis				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Técnicas de pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de biogás (metano e hidrogênio), bioetanol, celulose nanocristalina e outros bioprodutos químicos de valor agregado.				

Reuniu-se em ambiente virtual com link <https://conferenciaweb.rnp.br/sala/milla-alves-baffi>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, assim composta pelos Professores Doutores: Gisele de Fatima Leite Souza, da Universidade Federal de Uberlândia e Fernanda Palladino Pedroso, da Universidade Federal de São João Del-Rei; e Milla Alves Baffi, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Milla Alves Baffi, apresentou a Comissão Examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Milla Alves Baffi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 16/07/2025, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Palladino Pedroso, Usuário Externo**, em 16/07/2025, às 20:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele de Fatima Leite Souza, Usuário Externo**, em 17/07/2025, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6458520** e o código CRC **708BE950**.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

N244 2025	Nascimento, Andressa Moreira do, 1996- EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM HIDRÓXIDO DE AMÔNIO NA SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E SABUGO DE MILHO E PRODUÇÃO DE ETANOL 2G [recurso eletrônico] / Andressa Moreira do Nascimento. - 2025. Orientadora: Milla Alves Baffi. Coorientador: Daniel Pasquini. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biocombustíveis. Modo de acesso: Internet. DOI http://doi.org/10.14393/ufu.di.2025.423 Inclui bibliografia. 1. Biocombustível. I. Baffi, Milla Alves ,1977-, (Orient.). II. Pasquini, Daniel ,1974-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biocombustíveis. IV. Título. CDU: 662.756
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Célia, por doar sua vida em favor da minha, permitindo que eu pudesse realizar meus sonhos. Sua dedicação, amor e carinho são os maiores presentes que levarei comigo por toda a vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente à minha mãe, Célia, que é minha maior inspiração de força, coragem e resiliência. Agradeço ao meu pai, Donizetti, pelo apoio contínuo aos meus estudos desde a infância.

Aos meus tios Vicente de Paulo e Conceição, que são como segundos pais para mim. Em especial, à minha tia, por me escutar e acolher nos momentos difíceis.

Ao meu primo Lucas, por sua presença e apoio, que tantas vezes me guiaram. Minhas queridas primas Thalita, Beatriz e Jeoglene, que formam minha rede de apoio.

Ao meu companheiro de vida, Rubens, agradeço por me escutar, me apoiar e caminhar ao meu lado com paciência, carinho e compreensão, especialmente nos momentos em que estive ausente.

Aos queridos amigos Pedro, Anna Clara e Carol, agradeço pela amizade, pelo carinho e pelo apoio, ainda que indireto, ao longo desta jornada.

À minha orientadora, Milla Alves Baffi, agradeço pela confiança depositada ao aceitar me orientar, apoio e ensinamentos.

Ao meu coorientador, Daniel Pasquini, expresso minha gratidão pelo apoio constante e pelas contribuições valiosas que enriqueceram o desenvolvimento da pesquisa.

À Gisele, que esteve ao meu lado desde o início do mestrado, minha admiração e inspiração. Obrigada pela sua generosidade, por me acompanhar nos experimentos e pelos ensinamentos compartilhados.

Ao professor Gilvan Caetano Duarte, registro meu agradecimento por ter me apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis. Você foi um dos melhores professores que tive, e sua presença, mesmo que indireta, continua a me guiar.

Aos colegas de laboratório que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu agradecimento. De modo especial, agradeço à Daniela pela proximidade, amizade e palavras de incentivo, que foram fundamentais nos momentos mais difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço à Universidade Pública, em especial à Universidade Federal de Uberlândia, pelo seu compromisso com a democratização do conhecimento, justiça social e o desenvolvimento científico do país.

A todos vocês, o meu carinho e a minha gratidão.

“O que eu faço é uma gota no meio de um oceano. Mas sem ela, o oceano será menor.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas é uma etapa fundamental na produção de etanol de segunda geração (2G). Neste estudo, bagaço de cana-de-açúcar (BI) e sabugo de milho (SI) foram pré-tratados com hidróxido de amônio (NH_4OH) a 28–30 %, visando a desestruturação das biomassas para posterior sacarificação e fermentação alcoólica. O pré-tratamento promoveu elevada deslignificação, atingindo 65,50 % no bagaço (BT) e 73,50 % no sabugo (ST), com preservação da fração polissacarídica. As frações sólidas pré-tratadas foram submetidas à hidrólise enzimática com diferentes cargas de substrato (10 a 30%), utilizando 12,5 FPU/g de celulose do coquetel comercial Cellic CTec3. A hidrólise em batelada alimentada com 30% de biomassa resultou em concentrações superiores de açúcares redutores totais (ART) em comparação com o processo em batelada convencional (10%), alcançando 65,15 g/L em BT e 70,18 g/L em ST. Além disso, baixas concentrações de ácidos e inibidores foram detectadas nos hidrolisados, evidenciando a eficácia do pré-tratamento. Os hidrolisados obtidos em batelada alimentada apresentaram altos teores de açúcares fermentescíveis, com 43,75 g/L de glicose e 18,12 g/L de xilose em BT, e 41,63 g/L de glicose e 18,75 g/L de xilose em ST. Após a fermentação, os maiores rendimentos em etanol foram obtidos com o hidrolisado de ST, com 19,20 g/L ($Y_{p/s}$ de 0,49 e Q_p de 0,87), utilizando *Saccharomyces cerevisiae* Y904, e 26,34 g/L com *Spathaspora passalidarum* Y7204 ($Y_{p/s}$ de 0,44 e Q_p de 0,73), evidenciando eficiência fermentativa superior desta última, devido à fermentação de pentoses. Esses resultados evidenciam a eficácia do pré-tratamento com NH_4OH como método de baixo custo e com baixa formação de inibidores, destacando o potencial dos hidrolisados pré-tratados para a produção de etanol 2G.

Palavras-chave: Pré-tratamento alcalino. Etanol celulósico. Hidrólise enzimática. Fermentação.

ABSTRACT

The pretreatment of lignocellulosic biomass is a fundamental step in the production of second-generation (2G) ethanol. In this study, sugarcane bagasse (SBC) and corn cobs (CC) were pretreated with 28–30% ammonium hydroxide (NH₄OH) to break down the biomass for subsequent saccharification and alcoholic fermentation. The pretreatment promoted high delignification, reaching 65.50% for SBC and 73.50% for CC, with preservation of the polysaccharide fraction. The pretreated solid fractions were subjected to enzymatic hydrolysis with different substrate loads (10 to 30%), using 12.5 FPU/g of cellulose from the commercial Cellic CTec3 cocktail. Batch hydrolysis fed with 30% biomass resulted in higher concentrations of total reducing sugars (TRS) compared to the conventional batch process (10%), reaching 65.15 g/L in pretreated bagasse (SBCT) and 70.18 g/L in pretreated cob (CCT). In addition, low concentrations of acids and inhibitors were detected in the hydrolysates, demonstrating the effectiveness of this pretreatment. The hydrolysates obtained in the fed-batch process had high levels of fermentable sugars, containing 43.75 g/L of glucose and 18.12 g/L of xylose in SBCT, and 41.63 g/L of glucose and 18.75 g/L of xylose in CCT, respectively. After fermentation, the highest ethanol yields were obtained with the ST hydrolysate, with 19.20 g/L (Y_{p/s} of 0.49 and Q_p of 0.87), using *Saccharomyces cerevisiae* Y904, and 26.34 g/L with the pentose-fermenting yeast. *Spathaspora passalidarum* Y7204 (Y_{p/s} of 0.44 and Q_p of 0.73). Although the co-cultures showed promising results, aspects such as metabolic synergism, competition for substrates, and catabolic repression by glucose still require investigation. These results demonstrate the efficiency of pretreatment with NH₄OH as a low-cost method with low inhibitor formation, highlighting the potential of pretreated hydrolysates for 2G ethanol production.

Keywords: Alkaline pretreatment. Cellulosic ethanol. Enzymatic hydrolysis. Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas da produção de etanol lignocelulósico.....	16
Figura 2: Estruturas químicas da celulose, hemicelulose e lignina.	18
Figura 3: Estrutura química da celobiose	18
Figura 4: Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.....	20
Figura 5: Mecanismo enzimático das celulases.....	24
Figura 6: Vias metabólicas da glicose e xilose.....	26
Figura 7: Difrátogramas de raios-X das biomassas avaliadas	41
Figura 8: Espectros de FTIR das biomassas	44
Figura 9: Micrografias eletrônicas das superfícies das biomassas em diferentes ampliações.....	46
Figura 10: Teores de açúcares redutores totais (ART) das biomassas <i>in natura</i> e pré-tratadas após hidrólise enzimática em batelada com 10% de sólidos e em batelada alimentada com 30% de sólidos	48
Figura 11: Fermentação alcoólica de hidrolisados pré-tratados de bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> , bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, sabugo de milho <i>in natura</i> e sabugo de milho pré-tratado.....	38
Tabela 2: Índice de cristalinidade (I _{CR}) das biomassas.....	41
Tabela 3: Bandas de absorbância no FTIR típicas de biomassas lignocelulósicas.	42
Tabela 4: Concentração de açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação após processo de hidrólise batelada alimentada.....	49
Tabela 5: Produção de etanol a partir de hidrolisados de BT e ST por <i>S. cerevisiae</i> Y904 e <i>S. passalidarum</i> Y7204.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G	Etanol de primeira geração
2G	Etanol de segunda geração
3G	Etanol de terceira geração
4G	Etanol de quarta geração
ART	Açúcares Redutores Totais
BI	Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>
BT	Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado
C ₅	Fermentação de pentoses
C ₆	Fermentação de hexoses
CO ₂	Dióxido de carbono
DNS	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
DRX	Difratometria de Raios-X
FF	Furfuraldeído
FPU	Unidade de Filtro de Papel
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de
Fourier	
HMF	5-Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IC _R	Índice de Cristalinidade
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
RID	Detector de Índice de Refração
SI	Sabugo de milho <i>in natura</i>
ST	Sabugo de milho pré-tratado
TAPPI	Technical Association of the Pulp and Paper Industry
UV-VIS	Espectroscopia na Região do Ultravioleta
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Bioetanol.....	15
2.2 Subprodutos lignocelulósicos.....	16
2.2.1 Composição da biomassa lignocelulósica.....	17
2.2.2. Cultura de cana-de-açúcar e milho	19
2.3 Pré-tratamento.....	19
2.3.1 Pré-tratamento alcalino	21
2.4 Hidrólise enzimática	22
2.5 Enzimas lignocelulolíticas.....	23
2.6 Fermentação alcoólica.....	25
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Coleta e preparo das biomassas	27
4.2 Pré-tratamento com hidróxido de amônio.....	28
4.2.1 Rendimento do pré-tratamento.....	28
4.2.2 Cálculo da deslignificação	28
4.3 Caracterização das amostras <i>in natura</i> e pré-tratadas	29
4.3.1 Teor de lignina Klason insolúvel	29
4.3.2 Teor de lignina Klason solúvel	30
4.3.3 Teores de celulose e hemicelulose	31
4.3.4 Teor de umidade	32
4.3.5 Teor de cinzas	32
4.3.6 Teor de extrativos	33
4.3.7 Difração de Raios – X (DRX).....	33
4.3.8 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	34

4.3.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	34
4.4 Hidrólise enzimática	34
4.4.1 Hidrólise em batelada convencional	34
4.4.2 Hidrólise em batelada alimentada	35
4.5 Fermentação alcoólica.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Caracterização das biomassas	37
5.1.1 Composição química das biomassas	37
5.2 Hidrólise enzimática	47
5.3 Fermentação alcoólica.....	50
6 CONCLUSÃO	58

1 INTRODUÇÃO

A dependência energética é um desafio global, agravado pela predominância do uso de combustíveis fósseis, que expõe os países à volatilidade dos mercados internacionais, tensões geopolíticas e ao esgotamento de recursos naturais (Pang *et al.*, 2024). Nesse cenário, a busca por fontes renováveis, como os biocombustíveis, e com menor impacto ambiental torna-se necessária para a diversificação da matriz energética (Mankar *et al.*, 2021).

Entre os biocombustíveis, o etanol de segunda geração (etanol 2G), produzido a partir de subprodutos agroindustriais ricos em biomassa lignocelulósica, como bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho, representa uma alternativa promissora (Chanu *et al.*, 2023). No entanto, a natureza altamente complexa e recalcitrante desses materiais limita sua reutilização para a conversão eficiente em açúcares fermentáveis (Woźniak *et al.*, 2025). Dessa forma, é essencial que a biomassa passe por uma etapa de pré-tratamento, para aumentar a área superficial, reduzir a cristalinidade e tornar a celulose mais acessível à etapa de hidrólise enzimática (Zhao *et al.*, 2022).

Entre os pré-tratamentos atualmente utilizados, o método com álcalis, como o hidróxido de amônio (NH₄OH), tem demonstrado eficácia na remoção de lignina, facilitando o acesso à celulose e resultando em baixa formação de inibidores. A amônia é vantajosa também por provocar o inchaço das fibras, tornando-as mais acessíveis às enzimas, o que otimiza a reação e aumenta os rendimentos em açúcares (Abolore, Jaiswal e Jaiswal, 2024; Yuan *et al.*, 2022).

Outro fator importante na produção de etanol 2G é a etapa de sacarificação, que, majoritariamente, tem sido realizada com coquetéis enzimáticos comerciais contendo uma variedade de celulasas e hemicelulasas (Moya *et al.*, 2024). Estas enzimas atuam sinergicamente para degradar a fração polissacarídica em monômeros (glicose e xilose), promovendo a despolimerização de substratos lignocelulósicos (Zhai, Hu e Jin, 2022). Nesta etapa, o uso de alta carga de sólidos em batelada alimentada tem demonstrado elevada eficiência na bioconversão (Kim *et al.*, 2019).

Na última etapa, os açúcares presentes nos hidrolisados podem ser fermentados em etanol (Gomes, Vaz Júnior e Gurgel, 2024). Na fermentação alcoólica, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido a mais amplamente utilizada devido ao seu rápido crescimento, alta eficiência catabólica de hexoses (C₆) e elevada tolerância a estresses ambientais (Topaloğlu *et al.*, 2023). No entanto, esta espécie não é capaz de fermentar as pentoses (C₅) derivadas da fração hemicelulósica. Como alternativa, a utilização de leveduras

não convencionais, como a espécie *Spathaspora passalidarum*, tem recebido atenção especial devido à sua capacidade de co-fermentar glicose e xilose, aumentando os rendimentos em etanol 2G (Albuini *et al.*, 2023; Martinez-Jimenez *et al.*, 2021).

Neste contexto, o presente estudo avaliou o efeito do pré-tratamento alcalino com NH_4OH na hidrólise enzimática em batelada convencional e alimentada de bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho, com posterior fermentação dos hidrolisados, utilizando *S. cerevisiae* e *S. passalidarum*, separadas e em co-cultivo, visando otimizar a produção de etanol 2G.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bioetanol

Os biocombustíveis são combustíveis derivados de biomassa vegetal ou algal, que têm ganhado atenção global devido à crescente demanda por energia e à necessidade de reduzir as emissões de gases de efeito estufa (Guo *et al.*, 2022; Nunta *et al.*, 2023). Dentre os biocombustíveis, o bioetanol tem se destacado pela diversificação da matriz energética e pela menor emissão de poluentes, diminuindo a dependência de combustíveis fósseis (Santos *et al.*, 2023).

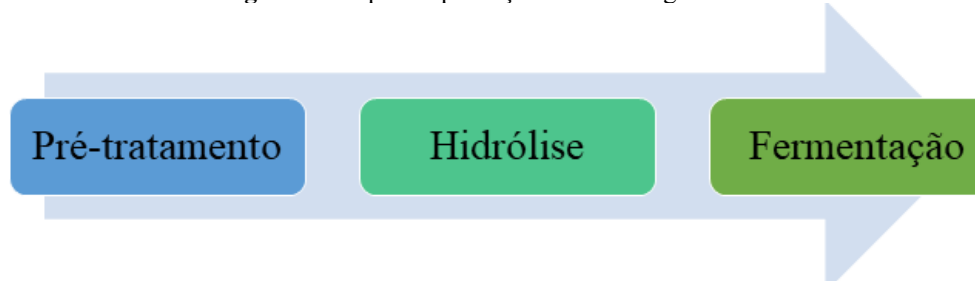
Atualmente, o Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais de etanol, com uma produção combinada de 82%, seguidos pela União Europeia (5%), China e Índia (3%) (Fu, Tu e Yuan, 2024; Pizarro *et al.*, 2025). Para o avanço na produção, é essencial selecionar a biomassa adequada, identificar suas características e entender suas propriedades. Neste sentido, quatro gerações de bioetanol podem ser exploradas (Lin e Lu, 2021).

O bioetanol de primeira geração (etanol 1G) é produzido a partir de culturas alimentares que contêm sacarose e amido, sendo amplamente comercializado (Kasaeian *et al.*, 2025). Cerca de 40% do etanol 1G é obtido de matérias-primas como cana-de-açúcar e beterraba, enquanto os 60% restantes são derivados de culturas ricas em amido, como o milho no contexto mundial (Guo *et al.*, 2022). No entanto, o etanol 1G apresenta limitações relacionadas à segurança alimentar e à preservação da biodiversidade, devido ao desmatamento necessário para o cultivo dessas matérias-primas.

Neste sentido, o etanol de segunda geração (etanol 2G) surge como uma alternativa renovável e sustentável para atender as demandas energéticas (Kumar *et al.*, 2019). Por sua vez, o etanol 2G possui excelente potencial, uma vez que utiliza biomassa lignocelulósica presente em subprodutos agroindustriais amplamente disponíveis (Devi *et al.*, 2022). No entanto, a natureza recalcitrante da biomassa é um dos principais desafios para a sua viabilidade econômica, que depende da remoção da lignina e da utilização eficiente da fração polissacarídica (Oliveira *et al.*, 2019; Kavitha *et al.*, 2020). A bioconversão do etanol 2G envolve três etapas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação alcoólica (Figura 1). O pré-tratamento remove lignina e hemicelulose, aumentando a porosidade da celulose e facilitando a etapa de hidrólise (Agrawal *et al.*, 2021; Pardo *et al.*, 2019). Durante a hidrólise (sacarificação), os polissacarídeos são hidrolisados em monossacarídeos com a ajuda de ácidos

ou enzimas (Devi *et al.*, 2022), sendo posteriormente fermentados em etanol e dióxido de carbono (CO₂), com uso de leveduras (Santos *et al.*, 2023).

Figura 1: Etapas da produção de etanol lignocelulósico.



Fonte: Autora.

O etanol de terceira geração (etanol 3G) é produzido a partir de biomassa de algas. As algas sintetizam grandes quantidades de carboidratos (celulose e amido) como forma de armazenamento de energia (Goswami *et al.*, 2022) e são consideradas uma matéria-prima promissora devido à alta taxa de crescimento, elevada eficiência fotossintética e facilidade de cultivo, além de não competirem com culturas alimentares (Müller *et al.*, 2023).

Por fim, o etanol de quarta geração (etanol 4G) envolve o uso da engenharia genética para aprimorar as características dos organismos utilizados na produção de etanol. Isso inclui a modificação genética de leveduras para produção de celulasas e hemicelulasas, a fermentação de hexoses (C₆) e pentoses (C₅), e o aumento da fotossíntese e da fixação de carbono (Cavelius *et al.*, 2023).

2.2 Subprodutos lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos representam uma fonte amplamente disponível, composta por subprodutos agrícolas, biomassa herbácea e lenhosa. Estima-se que cerca de 2,6 bilhões de toneladas desses materiais sejam gerados até 2030, com os agrícolas tendo 34% desse total (Lackner e Besharati, 2025; Rao *et al.*, 2024). Essas matérias-primas são constituídas por três componentes principais presentes na parede celular vegetal: celulose, hemicelulose e lignina, que formam uma estrutura altamente cristalina e estável (Singh *et al.*, 2022).

Dentre essas biomassas, os subprodutos de culturas como milho, soja e cana-de-açúcar, possuem elevado potencial para a produção de etanol 2G e outros bioprodutos, devido ao baixo custo e facilidade de armazenamento (Mujtaba *et al.*, 2023). Em países em desenvolvimento, esses subprodutos representam de 30 a 40% da massa das culturas, enquanto em países

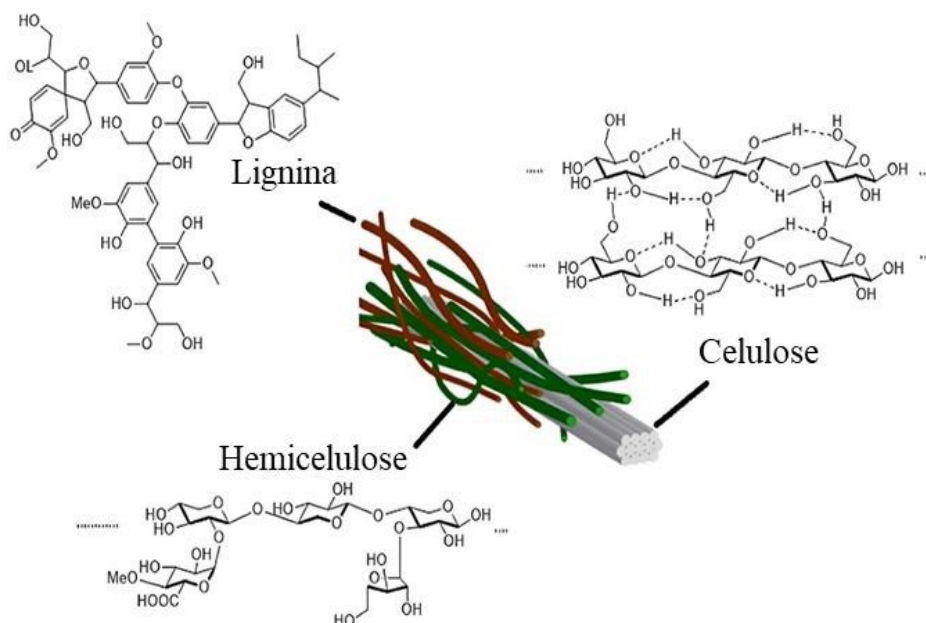
desenvolvidos essa proporção varia entre 10 e 20%, devido a práticas de colheita mais eficientes (FAO, 2019).

Biomassas, como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, a palha e o sabugo de milho, têm se destacado na produção de etanol 2G devido à alta disponibilidade e por não competirem com a alimentação humana e animal (Patel e Shah, 2021; Liu *et al.*, 2023). Nesse contexto, o reaproveitamento desses materiais contribui não apenas para a diversificação das fontes energéticas, mas também para a sustentabilidade das atividades agrícolas (Khaire, Moholkar e Goyal, 2021).

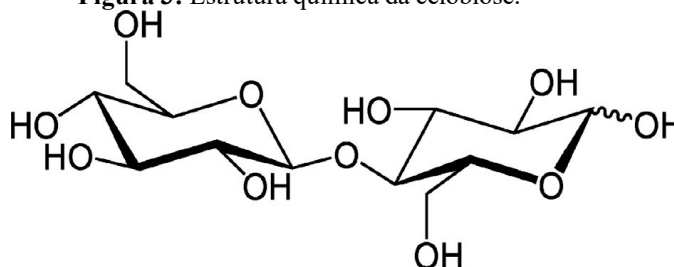
2.2.1 Composição da biomassa lignocelulósica

A lignocelulose é o principal componente da biomassa vegetal, constituindo uma estrutura complexa de alta recalcitrância e robustez, tornando-a resistente à despolimerização (Haq *et al.*, 2021). A biomassa lignocelulósica é composta por três componentes principais (Figura 2): celulose (35–55%), hemicelulose (20–40%) e lignina (10–25%), além de pequenas quantidades de proteínas, pectina, cinzas e extrativos orgânicos (Nargotra *et al.*, 2018; Rajesh Banu *et al.*, 2021).

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é um homopolímero linear não ramificado formado por monômeros de glicose. É composta por unidades de β-D-glicopirranose, ligadas por ligações glicosídicas β-(1,4), tendo a celobiose como unidade de repetição fundamental (Figura 3). As cadeias de celulose, formadas por 500 a 1400 unidades de D-glicose, organizam-se para formar microfibrilas, que são compactadas para criar fibrilas de celulose (Sharma *et al.*, 2023; Zoghlami e Paës, 2019). Ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals conectam cadeias de celulose vizinhas, reforçando o alinhamento paralelo e formando uma estrutura cristalina e com conformação estendida (Etale *et al.*, 2023).

Figura 2: Estruturas químicas da celulose, hemicelulose e lignina.

Fonte: Adaptado de Li & Takkellapati (2018).

Figura 3: Estrutura química da celobiose.

Fonte: Adaptado de Moré *et al.* (2019).

As hemiceluloses ($C_5H_8O_4$)_n são heteropolímeros ramificados, com 50 a 3.000 unidades de açúcares, que se ligam às fibras de celulose por interações não covalentes e à lignina por ligações covalentes, formando uma rede complexa que fornece resistência estrutural (Haq *et al.*, 2021; Toor *et al.*, 2020). As hemiceluloses contêm polímeros ramificados e lineares, formados por uma variedade de açúcares anidros, como D-xilose, arabinose, ácido D-glucurônico, L-ramnose, entre outros. Estes polissacarídeos apresentam natureza amorfa, tendo a xilana como principal componente (Shrestha *et al.*, 2021).

A lignina [$C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0,9-1,7}$]_n é uma macromolécula polifenólica composta por três monolignóis: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarico. Esses monolignóis se combinam para formar uma estrutura aromática que inclui guaiacil, siringil e p-hidroxifenil (Salleh *et al.*, 2023). A lignina é uma estrutura irregular e não cristalina, sem uma organização primária definida, formada pela polimerização de radicais livres de precursores alcoólicos

(Ashokkumar *et al.*, 2022). Ela funciona como uma "cola celular", fornecendo resistência e proteção contra ataques de microrganismos. Essa robustez faz com que a lignina seja um fator limitante na conversão de lignoceluloses em etanol 2G (Haldar *et al.*, 2022).

2.2.2. Cultura de cana-de-açúcar e milho

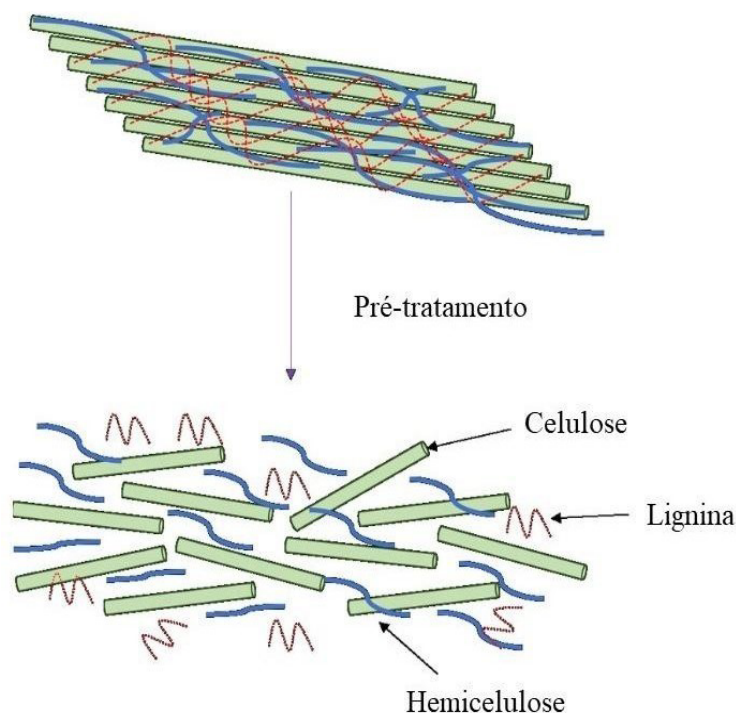
Os subprodutos provenientes das usinas de açúcar e álcool, como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, são gerados durante a colheita, moagem e esmagamento da cana para a extração do caldo. Esses materiais, especialmente o bagaço, são utilizados para a geração de vapor e eletricidade nas caldeiras, por sistemas de cogeração. Além disso, também têm sido explorados em outras aplicações, como biorrefinarias e a produção de etanol 2G, devido à sua disponibilidade e baixo custo (Patel e Shah, 2021; Ungureanu, Vlăduț e Biriș, 2022). No caso do milho, tanto a palha quanto o sabugo são também fontes promissoras de açúcares fermentescíveis (Nunta *et al.*, 2023), com potencial para a produção de etanol 2G (Silva *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2022).

Devido à sua vasta disponibilidade e ao alto conteúdo de polissacarídeos, esses subprodutos têm sido explorados na produção de etanol 2G e em biorrefinarias (Mariana *et al.*, 2021; Mujtaba *et al.*, 2023).

2.3 Pré-tratamento

A conversão da biomassa lignocelulósica enfrenta desafios causados pela complexa interação entre lignina, hemicelulose e celulose (Deng *et al.*, 2023). Devido à sua recalcitrância, uma etapa de pré-tratamento é essencial para desestruturar e modificar sua composição, preservando a hemicelulose e diminuindo a cristalinidade da celulose, impactando diretamente na eficácia das etapas subsequentes (Figura 4) (Banu J *et al.*, 2021; Devi *et al.*, 2021).

Figura 4: Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Latif *et al.* (2018).

Os pré-tratamentos podem ser classificados em físicos, químicos, biológicos ou combinações desses (Abd *et al.*, 2025; Chaurasia *et al.*, 2025), sendo escolhidos de acordo com os objetivos desejados, já que diferentes mecanismos podem resultar na produção de variados produtos (Abolore, Jaiswal e Jaiswal, 2024).

O pré-tratamento físico, por exemplo, reduz o tamanho das partículas e a cristalinidade da celulose, utilizando moinhos, trituradores e radiação ultravioleta ou micro-ondas (Mankar *et al.*, 2021; Roy; Rahman; Raynie, 2020). No entanto, isoladamente, este método não é eficaz. Estudos mostram que sua combinação com produtos químicos pode reduzir a quantidade de reagentes utilizados, tornando-se promissora para biorrefinarias (Zhou e Tian 2022). Portanto, utilizam-se processos físico-químicos, tais como métodos alcalinos, ácidos, organosolve e explosão a vapor (Ebrahimian *et al.*, 2023). Os pré-tratamentos químicos concentram-se no uso de ácidos orgânicos ou inorgânicos, álcalis e solventes orgânicos. Comumente, os ácidos são empregados devido a sua capacidade de dissolver facilmente a hemicelulose, melhorar a porosidade da biomassa e tornar a celulose mais acessível (Ebrahimian *et al.*, 2023; Tong *et al.*, 2023). No entanto, este processo pode gerar compostos tóxicos, como ácido acético (CH_3COOH), ácido fórmico (CH_2O_2), furfuraldeído (FF) e 5-hidroximetilfurfural (HMF), que

inibem enzimas e microrganismos fermentativos (Woiciechowski *et al.*, 2020). Além disso, apresenta altos custos de recuperação dos ácidos e requer equipamentos resistentes à corrosão (Solarte-Toro *et al.*, 2019).

O pré-tratamento biológico, por sua vez, é realizado por fungos, bactérias, consórcios microbianos ou enzimas capazes de degradar a lignina e hidrolisar parcialmente a hemicelulose (Anu *et al.*, 2020). Esse método é uma alternativa ecologicamente correta para melhorar a digestibilidade da biomassa, reduzindo o consumo de energia e operando em condições de baixa temperatura, evitando a formação de inibidores (Atelge *et al.*, 2020). No entanto, essa abordagem apresenta limitações, como o alto custo e o longo tempo de tratamento, durante o qual as cepas microbianas podem consumir os açúcares disponíveis (Wu *et al.*, 2022).

Em geral, os pré-tratamentos ideais devem ser economicamente viáveis em termos de custos operacionais, eficazes na desintegração das fibras e requerer a menor quantidade possível de reagentes. Além disso, o método escolhido deve aumentar a porosidade do material e reduzir a cristalinidade, facilitando, assim o acesso das enzimas às cadeias poliméricas (Baruah *et al.*, 2018).

2.3.1 Pré-tratamento alcalino

Os pré-tratamentos alcalinos, especialmente aqueles baseados em amônia, oferecem vantagens significativas em relação aos métodos ácidos, devido à baixa corrosividade, baixa toxicidade e à capacidade de recuperação da amônia pós-tratamento, que pode ser empregada na produção de fertilizantes, aumentando a sustentabilidade do processo (Kim; Lee; Kim, 2016a; Oladi; Aita, 2017). Esses métodos têm como principais efeitos a remoção ou modificação da lignina, o aumento da área superficial e/ou do tamanho dos poros, além da alteração na remoção dos grupos acetil e dos subprodutos de ácido urônico da hemicelulose, tornando a biomassa mais suscetível à hidrólise (Abolore, Jaiswal e Jaiswal, 2024; Javanmard *et al.*, 2024).

Entre os álcalis utilizados, o hidróxido de amônio (NH_4OH) minimiza a degradação dos carboidratos, aumenta a área superficial da lignocelulose, melhora a deslignificação e resulta na baixa geração de inibidores (Aita, Salvi, Walker, 2011; Chundawat *et al.*, 2011). Além disso, soluções comerciais de amônia geralmente contêm de 25 a 30%, dispensando a adição de água ao meio reacional. Este processo ainda apresenta a vantagem de que a maior parte da amônia

evapora naturalmente, permitindo o uso direto da biomassa tratada (Mes-Hartree, Dale e Craig, 1988).

Dessa forma, o material tratado com NH_4OH torna-se um substrato adequado para a hidrólise enzimática, enquanto a amônia residual pode servir como fonte de nitrogênio para os microrganismos durante a fermentação. Além disso, a amonização dos grupos metoxila presentes na lignina impede que estes se liguem de forma ineficiente às celulasas (Cao *et al.*, 2023; Park *et al.*, 2017). A amônia também possui a capacidade única de alterar a cristalinidade da celulose de sua forma nativa (celulose I) para uma forma alomorfa (celulose III), que melhora a acessibilidade enzimática e aumenta a digestibilidade (Balan, Mohammadi e Dale, 2025). Portanto, o pré-tratamento com NH_4OH é uma alternativa promissora para a valorização de subprodutos lignocelulósicos, promovendo modificações estruturais que favorecem a eficiência hidrolítica e fermentativa.

2.4 Hidrólise enzimática

A hidrólise (sacarificação) consiste na fragmentação das cadeias poliméricas da biomassa lignocelulósica, convertendo os polissacarídeos em açúcares simples (Shukla *et al.*, 2023). Existem duas abordagens frequentemente empregadas: a hidrólise ácida e a enzimática. Em ambas as metodologias, há diversas modalidades de operação, e a seleção do método mais apropriado deve considerar o tipo de matéria-prima utilizada, o microrganismo empregado para fermentar os açúcares liberados e a análise de custo-benefício.

Na hidrólise ácida, utilizam-se ácidos inorgânicos em soluções aquosas, tanto diluídos quanto concentrados. Os ácidos comumente empregados são o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido clorídrico (HCl) (Mekala *et al.*, 2014). A hidrólise ácida concentrada é conduzida em temperaturas baixas, em torno de 30°C , resultando em elevados rendimentos de hexoses (C_6) e pentoses (C_5). No entanto, o uso de grandes volumes de ácido requer uma recuperação eficiente deste, além de causar danos aos equipamentos devido à corrosão e inibidores do processo fermentativo. A hidrólise ácida diluída opera com concentrações menores de ácido, mas requer temperaturas elevadas, o que também representa uma desvantagem (Ogeda e Petri, 2010).

Recentemente, a hidrólise enzimática tem ganhado destaque devido à sua capacidade de conduzir reações altamente específicas em condições operacionais mais brandas, com pH em torno de 4,5-5,0, temperatura de 50°C e pressão atmosférica, reduzindo assim a formação de subprodutos indesejáveis e danos aos equipamentos (Wang e Lü, 2021; Sawarkar *et al.*, 2022).

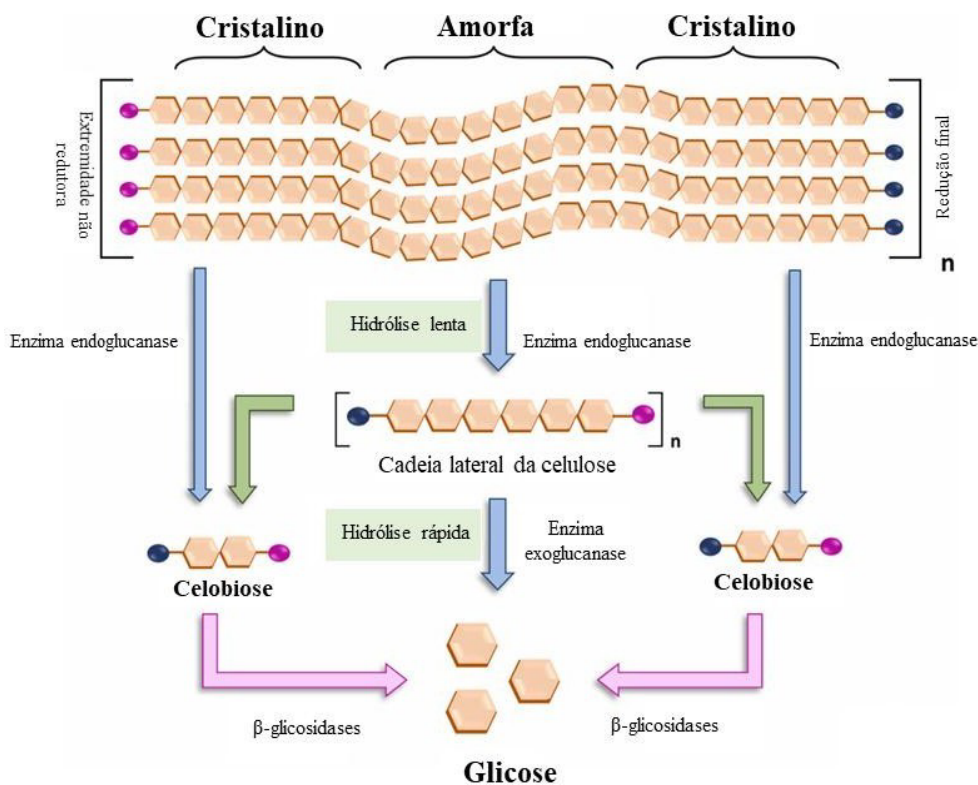
A hidrólise da celulose ocorre pela ação conjunta de três celulasas (exoglucanase, endoglucanase e β -glicosidase), para decompô-la em oligossacarídeos, celobiose e glicose (Sharma *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2023). No entanto, alcançar um alto rendimento na hidrólise enzimática requer um tempo de reação prolongado, além da necessidade de melhorar a acessibilidade das enzimas à celulose por meio do pré-tratamento das matérias-primas, conforme mencionado anteriormente (Abolore, Jaiswal e Jaiswal, 2024).

2.5 Enzimas lignocelulolíticas

As enzimas lignocelulolíticas são proteínas extracelulares produzidas por fungos e bactérias, cuja principal função é promover a despolimerização da biomassa. Estas enzimas incluem as ligninases, que atuam na quebra da lignina (peroxidases e oxidases) e as hidrolíticas (celulasas e hemicelulasas), que degradam a fração polissacarídica em oligo e monossacarídeos (Chukwuma *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2022).

Nas sacarificações enzimáticas, coquetéis comerciais, compostos principalmente por celulasas e hemicelulasas, são comumente empregados. Nos sistemas celulolíticos, as enzimas atuam na hidrólise das ligações glicosídicas β -(1,4) presentes na celulose, resultando na liberação de subunidades monoméricas fermentáveis (Figura 5). As endoglucanases (EC 3.2.1.4) catalisam a quebra das ligações β -1,4-glicosídicas nas regiões amorfas externas da celulose. As exoglucanases (EC 3.2.1.91), por sua vez, são responsáveis pela clivagem das extremidades redutoras e não redutoras. Por fim, as β -glicosidases (EC 3.2.1.21), clivam a celobiose, liberando duas moléculas de glicose (Benatti; Polizeli, 2023; Ejaz; Sohail; Ghanemi, 2021). Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Rhizopus* estão entre os principais produtores industriais dessas enzimas (Benatti e Polizeli, 2023).

Figura 5: Mecanismo enzimático das celulasas.



Fonte: Adaptado de Ranjan *et al.* (2023).

As hemicelulasas compreendem um grupo mais complexo, incluindo endo-1,4-β-galactanase (EC 3.2.1.89), acetil-xilana esterase (EC 3.1.1.72), α-galactosidase (EC 3.2.1.22), α-l-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), endo-1,4-β-manase (EC 3.2.1.78), acetil manano esterase (EC 3.1.1.6), exo-1,4-β-xilosidase (EC 3.2.1.37), esterase do ácido ferúlico (EC 3.1.1.73), esterase do ácido p-cumárico (EC 3.1.1.102), exo-1,4-β-manosidase (EC 3.2.1.25), α-glucuronidase (EC 3.2.1.139), endo-α-1,5-arabinanase (EC 3.2.1.99) e endo-1,4-β-xilanase (EC 3.2.1.8) (Wang *et al.*, 2021). Essas enzimas atuam de forma sinérgica, promovendo a degradação completa dos polímeros hemicelulósicos. Dentre as hemicelulasas, as xilanases e β-xilosidases constituem as principais enzimas, sendo que as endo-1,4-β-xilanases (EC 3.2.1.8) hidrolisam as ligações β-1,4-glicosídicas da cadeia de xilana, produzindo xilo-oligossacarídeos, e a β-xilosidase (EC 3.2.1.37) hidrolisa esses xiloligossacarídeos em unidades de xilose (Rohman, Dijkstra e Puspaningsih, 2019).

2.6 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico realizado por leveduras, que convertem monossacarídeos derivados da biomassa (hexoses - C₆ e pentoses - C₅) em etanol e CO₂ (Malik *et al.*, 2022; Naveed *et al.*, 2024). A conversão de açúcares C₆ inicia-se com a quebra da glicose para formar moléculas de piruvato, processo conhecido como glicólise. A glicólise de uma molécula de glicose produz duas moléculas de piruvato. Na ausência ou limitação de oxigênio, essas duas moléculas de piruvato são descarboxiladas em duas moléculas de acetaldeído e duas de CO₂. O etanol é então produzido a partir da redução do acetaldeído (Figura 6) (Maicas, 2020; Malakar, Paul e Jolvis Pou, 2020).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais utilizado para produção de etanol, devido ao seu rápido crescimento, alto rendimento em etanol a partir de açúcares C₆ e tolerância a substâncias tóxicas (Topaloğlu *et al.*, 2023). Entretanto, o seu metabolismo e a produção de etanol são influenciados por diversos fatores. A temperatura ideal para a fermentação varia entre 28 e 30°C, com um pH adequado entre 4,0 e 5,0. A taxa de agitação, que normalmente varia de 150 a 200 rpm, também é um fator essencial para o transporte eficiente de nutrientes do meio extracelular para as células e para o transporte do etanol ao ambiente extracelular (Kolo *et al.*, 2024; Azhar *et al.*, 2017). No entanto, essas leveduras não têm a capacidade de fermentar pentoses (Carlson, 1998; Chandukishore *et al.*, 2024; Kayikci; Nielsen, 2015).

A fermentação de açúcares C₅ pode ser realizada por leveduras não-*Saccharomyces*, também denominadas não convencionais, que são capazes de metabolizar a xilose derivada da hemicelulose. Essas leveduras se destacam por sua tolerância a inibidores e, em algumas espécies, às variações de temperatura (Ndubuisi *et al.*, 2023; Wives *et al.*, 2024). A fermentação da xilose ocorre pela via das pentoses-fosfato (Figura 6), que é composta por processos oxidativos e não oxidativos (Li *et al.*, 2018). O metabolismo da D-xilose envolve sua conversão em D-xilulose, seguida de sua fosforilação em D-xilulose-5-fosfato (Bertels, Murillo e Heinisch, 2021). As leveduras utilizam o processo oxidativo nessa transformação, empregando duas enzimas: a xilose redutase (XR), que converte xilose em xilitol em uma reação dependente de NADH ou NADPH, e a xilitol desidrogenase (XD), que oxida o xilitol em xilulose, com o NAD⁺ como coenzima (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994; Wives *et al.*, 2024). A xilulose é então fosforilada pela enzima xilulose quinase (XQ) em xilulose-5-fosfato, que entra na via das pentoses-fosfato para ser convertida em frutose-6-P e, posteriormente, metabolizada em

próximo ao rendimento teórico de 0,51 g/g de *S. cerevisiae* (Long *et al.*, 2012; Su, Willis e Jeffries, 2015).

Nesse sentido, *S. passalidarum* demonstra alta produtividade, eficiência no processo e elevado rendimento em etanol, representando uma alternativa promissora na produção de etanol 2G (Farias e Maugeri-Filho, 2021). Dessa forma, fermentações alcoólicas de hidrolisados de biomassas lignocelulósicas podem ser conduzidas com linhagens de *S. cerevisiae* isoladamente ou em associação com leveduras fermentadoras de pentoses para aumentar o rendimento em etanol 2G (Mesa *et al.*, 2020; Ritika *et al.* 2023).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do pré-tratamento alcalino com NH_4OH na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho, com posterior aplicação na produção de etanol 2G, utilizando as leveduras *S. cerevisiae* (Y904) e *S. passalidarum* (UFMG-CM-Y7204).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar pré-tratamento com NH_4OH de bagaço-de-cana-açúcar e sabugo de milho;
- Caracterizar estruturalmente bagaço de cana-açúcar e sabugo de milho *in natura* e pré-tratados;
- Quantificar os teores de celulose, hemicelulose e lignina antes e após o pré-tratamento;
- Obter açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática utilizando coquetel comercial;
- Produzir etanol 2G e determinar parâmetros fermentativos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e preparo das biomassas

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BI) foram obtidas da Usina Vale do Tijuco (Companhia Mineira de Açúcar e Álcool), situada em Uberaba, MG. As amostras de sabugo de milho *in natura* (SI) foram fornecidas pela empresa JC Rações e Insumos

Siderúrgicos, localizada em Uberlândia, MG. SI foi submetido à moagem em moinho de facas (Marconi, modelo MA 048, mesh 20, 0,85 mm), visando à redução granulométrica da biomassa para subsequente processamento e BI foi utilizado da forma como foi recebido pela usina, após a etapa de moagem (Marconi, modelo MA 580, Mesh 30, 0,59 mm) e secagem.

4.2 Pré-tratamento com hidróxido de amônio

O pré-tratamento de BI e SI foi realizado em um reator de bancada Parr (Parr Instrument Company, modelo 4848), equipado com sistema de aquecimento e regulação de temperatura. As amostras foram tratadas com NH_4OH a 28–30% (m/v), na proporção de 1:10 (m/v), durante 30 minutos a 180 °C (Kim *et al.*, 2016b; Yu *et al.*, 2013). Após o pré-tratamento, as amostras foram trituradas novamente em um liquidificador comercial. Em seguida, a mistura foi filtrada a vácuo para separar as frações sólida e líquida. A fração sólida foi lavada com cerca de 500 mL de água deionizada e congelada.

4.2.1 Rendimento do pré-tratamento

O rendimento do pré-tratamento com NH_4OH foi calculado pela Equação 1:

$$R (\%) = \frac{M_f}{M_i} \cdot 100\% \quad (1)$$

Sendo:

$R \rightarrow$ Rendimento do pré-tratamento;

$M_i \rightarrow$ Massa inicial da biomassa *in natura*;

$M_f \rightarrow$ Massa final da biomassa após o pré-tratamento.

4.2.2 Cálculo da deslignificação

A deslignificação das biomassas pré-tratadas com NH_4OH foi calculada pela Equação 2:

$$\%deslignificação = \frac{LK_{biomassa} - \left[\frac{LK_{polpa} \cdot R}{100} \right]}{LK_{biomassa}} \cdot 100\% \quad (2)$$

Onde:

$LK_{biomassa}$ → Lignina Klason da biomassa *in natura*;

LK_{polpa} → Lignina Klason da biomassa após o pré-tratamento;

R → Rendimento.

4.3 Caracterização das amostras *in natura* e pré-tratadas

4.3.1 Teor de lignina Klason insolúvel

A determinação da lignina Klason insolúvel foi realizada seguindo a norma TAPPI T 222 om-88. Inicialmente, pesou-se 1,0 g de biomassa seca, que foi transferida para um almofariz. Em seguida, foram adicionados 15 mL de solução de H₂SO₄ a 72% (m/m), e a amostra foi macerada por 2 horas até atingir o máximo de desfibramento. Após esse período, a amostra foi transferida para um balão de fundo redondo de 1 L, e a mistura foi completada com 560 mL de água destilada para que a concentração de H₂SO₄ fosse de 3% (m/m). A amostra foi aquecida em sistema de refluxo por 4 horas a 121 °C.

Em seguida, a solução foi filtrada em funil de vidro sinterizado nº 4, previamente seco e tarado. Coletou-se 50 mL do filtrado para a análise de lignina solúvel, e o teor de polissacarídeos foi determinado por cromatógrafo (Shimadzu™ LC-20A Prominence), equipado com coluna Supelcogel™ C-610H (30 cm × 7,8 mm), mantida a 32 °C, utilizando eluição isocrática a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min (NREL LAP-002). Foram empregados detectores de ultravioleta (operando a 210 nm) e de índice de refração (RID). As amostras foram diluídas com a fase móvel (solução aquosa de H₂SO₄ 0,005 mol/L), e filtradas por membrana Millipore® (0,20 µm, Chromafl® Xtra CA-20/25) para separar a lignina solúvel e demais produtos. O funil, contendo a lignina insolúvel, foi seco em estufa a 105 °C por 12 horas, resfriado em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesado. O conteúdo de lignina insolúvel foi calculado pela relação entre a porcentagem de massa de lignina insolúvel e a massa inicial da amostra seca, conforme a equação 3:

$$LK_i (\%) = \frac{(M_i - M_f)}{(M_f)} \cdot 100\% \quad (3)$$

Onde:

$LK_i \rightarrow$ Teor de lignina Klason insolúvel;

$M_i \rightarrow$ Massa de lignina insolúvel seca, após secagem em estufa;

$M_f \rightarrow$ Massa inicial da amostra.

4.3.2 Teor de lignina Klason solúvel

O filtrado coletado após a determinação da lignina Klason insolúvel foi utilizado para a quantificação da lignina solúvel. As amostras foram diluídas com água destilada para atingir uma concentração final de 0,05 mol/L de H_2SO_4 . Uma solução de referência, com a mesma concentração de 0,05 mol/L, foi preparada a partir de H_2SO_4 a 72%. As amostras foram, então, quantificadas por espectroscopia UV-VIS, e a absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 215 nm e 280 nm. A concentração de lignina Klason solúvel foi calculada usando a equação 4.

$$C (g/L) = \frac{[(4,53 \cdot A_{215}) - A_{280}]}{300} \quad (4)$$

Sendo:

$C (g/L) \rightarrow$ Concentração da lignina Klason solúvel em meio ácido;

$A_{215} \rightarrow$ Valor da absorbância em 215 nm;

$A_{280} \rightarrow$ Valor da absorbância em 280 nm.

A absorbância a 280 nm corresponde à correção para os compostos de furfuraldeído gerados no processo de hidrólise, que podem interferir na medição da lignina solúvel, enquanto a 215 nm determina-se a concentração da lignina solúvel. Dessa forma, a Equação 4 resulta da resolução das equações simultâneas 5 e 6:

$$A_{280} = 0,68 C_D + 18 C_L \quad (5)$$

$$A_{215} = 0,15 C_D + 70 C_L$$

(6)

Onde:

A_{280} → Valor de absorbância a 280 nm;

A_{215} → Valor de absorbância a 215 nm;

C_D → Concentração dos carboidratos (g/L);

C_L → Concentração de lignina solúvel (g/L).

Os valores 0,68 e 0,15 representam a absorbância molar dos produtos de decomposição de carboidratos a 280 e 215 nm, respectivamente, enquanto os valores 18 e 70 correspondem à absorbância molar de lignina solúvel em 280 e 215 nm, respectivamente.

4.3.3 Teores de celulose e hemicelulose

Os teores de celulose e hemicelulose foram determinados por HPLC, utilizando o filtrado coletado na determinação do teor de lignina Klason insolúvel (item 4.3.1). Neste procedimento, celobiose, glicose, ácido fórmico e HMF foram convertidos em celulose, enquanto arabinose, xilose, ácido acético e FF foram convertidos em hemicelulose (Pasquini *et al.*, 2005). As concentrações de açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose), ácidos orgânicos (ácido fórmico e ácido acético) e produtos de degradação (furfural (FF) e 5-hidroximetilfurfural (HMF)), foram determinadas a partir de curvas analíticas obtidas com padrões de alta pureza (Fornazier *et al.*, 2024). As conversões foram realizadas utilizando as Equações 7 e 8, nas quais a concentração do analito é multiplicada por seus respectivos fatores de conversão (Gurgel *et al.*, 2014):

$$\text{Celulose (\%)} = \left[\frac{(0,95_{\text{Celobiose}} + 0,9_{\text{Glicose}} + 3,52_{\text{Ácido fórmico}} + 1,29_{\text{HMF}}) V_{\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4}}{M_i} \right] \cdot 100\% \quad (7)$$

$$\text{Hemicelulose (\%)} = \left[\frac{(0,88_{\text{Xilose}} + 0,88_{\text{Arabinose}} + 0,717_{\text{Ácido acético}} + 13,75_{\text{FF}}) V_{\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4}}{M_i} \right] \cdot 100\% \quad (8)$$

Onde:

$M_i \rightarrow$ Massa inicial da amostra.

4.3.4 Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado pesando 2,0 g de biomassa em cadinho de porcelana previamente tarado e seco. Em seguida, o conjunto foi colocado em estufa a 105 °C por 2 horas, resfriado em dessecador até atingir a temperatura ambiente e, então, novamente pesado (TAPPI T 264 om-88). O processo foi repetido com nova secagem a 105 °C por 1 hora, até obter-se uma massa constante. O teor de umidade foi calculado pela diferença percentual entre a massa inicial e a massa final da amostra após o processo de secagem, conforme a Equação 9.

$$U(\%) = \frac{(W_i - W_c) - (W_{cf} - W_c)}{(W_i - W_c)} \cdot 100\% \quad (9)$$

Sendo:

$U \rightarrow$ Porcentagem de umidade;

$W_i \rightarrow$ Massa inicial do cadinho, somada à massa da biomassa e umidade;

$W_c \rightarrow$ Massa inicial do cadinho;

$W_{cf} \rightarrow$ Massa final do cadinho, somada à massa da biomassa após o processo de secagem.

4.3.5 Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado conforme norma TAPPI T211 OM-93. Pesou-se 1,0 g de biomassa em cadinho previamente seco e tarado, sendo posteriormente acondicionado em forno mufla a 800 °C por 2 horas. Em seguida, o sistema foi resfriado em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesado. A porcentagem de cinzas foi calculada com base na porcentagem da massa do resíduo após a calcinação, em relação à massa inicial da amostra seca, conforme Equação 10:

$$C(\%) = \frac{(W_{cf} - W_c)}{(W_b)} \cdot 100\% \quad (10)$$

Onde:

$C \rightarrow$ Porcentagem de cinzas;

$W_{cf} \rightarrow$ Massa do cadinho contendo as cinzas após a calcinação;

$W_c \rightarrow$ Massa inicial do cadinho;

$W_b \rightarrow$ Massa da biomassa antes do processo.

4.3.6 Teor de extrativos

A determinação do teor de extrativos das amostras *in natura* foi realizada de acordo com a norma TAPPI T 204 cm-97. Pesou-se 10,0 g de cada biomassa, que foram colocadas separadamente em cartuchos de papel de filtro e submetidas à extração em um extrator Soxhlet. A determinação de extrativos polares foi realizada utilizando 1 L de água destilada por 50 horas. O mesmo procedimento foi adotado para os extrativos apolares, com o uso de uma mistura de ciclohexano/etanol (1:1 v/v). Após esse período, o resíduo foi seco em estufa a 105 °C por 12 horas e, em seguida, resfriado em dessecador até atingir a temperatura ambiente. O conteúdo de extrativos solúveis foi calculado pela diferença de massa da amostra antes e após a extração, conforme a Equação 11.

$$E(\%) = \frac{(W_{ci} - W_p) - (W_{cf} - W_p)}{(W_{ci} - W_p)} \cdot 100\% \quad (11)$$

Sendo:

$E \rightarrow$ Porcentagem de extrativos;

$W_{ci} \rightarrow$ Massa da biomassa inicial com extrativos, antes do processo de extração somada com a massa do papel de filtro;

$W_p \rightarrow$ Massa do papel de filtro;

$W_{cf} \rightarrow$ Massa da biomassa livre de extrativos após o processo de extração somada com a massa do papel de filtro.

4.3.7 Difração de Raios – X (DRX)

O índice de cristalinidade (I_c) foi determinado utilizando difratômetro XRD-6000 (Shimadzu), pertencente ao Laboratório de Caracterização de Materiais da Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM-UFU). A faixa de ângulos 2θ escolhida foi de 4 a 45°.

velocidade de varredura de 2°/min, potência de 40 kV, corrente de 30 mA e radiação CuK α (1,5406 Å). O índice de cristalinidade foi calculado pela Equação 12 (Segal *et al.*, 1959):

$$I_c (\%) = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \cdot 100\% \quad (12)$$

Onde:

$I_c \rightarrow$ Porcentagem de cristalinidade;

$I_{002} \rightarrow$ Intensidade de difração máxima em unidades arbitrárias do plano 022, representando regiões cristalinas e amorfas;

$I_{am} \rightarrow$ Intensidade do material amorfo em $2\theta = 18$.

4.3.8 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise dos grupos funcionais das amostras foi realizada utilizando espectrofotômetro (Shimadzu™ Prestige-21 IR), localizado no RELAM-UFU. As amostras foram pastilhadas com brometo de potássio (KBr), na proporção de 1:100 (m/m), e os espectros foram analisados no intervalo de 4500 a 500 cm^{-1} , com resolução do equipamento de 4 cm^{-1} e 32 varreduras (Silva *et al.*, 2018).

4.3.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras foram analisadas quanto à superfície utilizando microscópio eletrônico de varredura (Tescan VEGA 3 LMU), localizado no RELAM-UFU. As amostras foram fixadas em suportes de alumínio, com fita de carbono e metalizadas com ouro, com ampliações de 100x, 500x, 1, 00 kx, 5,00 kx e 10,000 kx, e tensão de aceleração de 5 KV (Machado *et al.*, 2020).

4.4 Hidrólise enzimática

4.4.1 Hidrólise em batelada convencional

As sacarificações do bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho *in natura* e após o pré-tratamento foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo tampão citrato de

sódio (0,05 mol/L, pH 4,8), razão líquido-sólido de 10 mL/g (10%) e solução comercial Cellic CTec3 (Novozymes), com carga enzimática de 12,5 FPU/g de celulose. Os ensaios foram conduzidos em triplicatas a 150 rpm e 50 °C por 72 horas (Rodrigues *et al.*, 2022). Após as hidrólises, as frações líquidas contendo os açúcares liberados (hidrolisados) foram filtradas em Millipore® (0,20 µm, Chromafil® Xtra CA-20/25) sendo centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, a concentração de açúcares redutores totais (ART) foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para tanto, 100 µL do hidrolisado foi misturado com 100 µL da solução de DNS, e a mistura foi aquecida em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 800 µL de água destilada à mistura, e a absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (Metash, modelo UV-5100) a 540 nm (Miller, 1959).

4.4.2 Hidrólise em batelada alimentada

A hidrólise em batelada alimentada foi realizada nas mesmas condições experimentais, porém com adição gradual de biomassa. O método foi adaptado para incluir adições de 5% de substrato a cada 12 horas até atingir um total de 30% de sólidos (adições em 12, 24, 36 e 48 horas). Após 72 horas, as frações líquidas contendo os açúcares liberados foram submetidas à filtração e posteriormente centrifugadas (Rodrigues *et al.*, 2022). A concentração de ART foi determinada utilizando o método do DNS (Miller, 1959).

As concentrações de açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose), ácido fórmico, ácido acético, FF e HMF nos hidrolisados da batelada alimentada foram determinadas por HPLC. As amostras foram diluídas com a fase móvel (solução aquosa de H₂SO₄ a 0,05 mol/L), filtradas através de Millipore® (0,20 µm, Chromafil® Xtra CA-20/25) e introduzidas em cromatógrafo (Shimadzu™ LC-20A Prominence) equipado com coluna Supelcogel™ C-610H (30 cm x 7,8 mm), mantida a 32 °C, utilizando eluição isocrática a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. Foram empregados detectores de ultravioleta (operando a 210 nm) e de Índice de Refração (RID). Os teores dos compostos foram determinados a partir de curvas analíticas obtidas com padrões de alta pureza (Fornazier *et al.*, 2024).

4.5 Fermentação alcoólica

As leveduras *S. cerevisiae* (Y904) e *S. passalidarum* (UFMG-CM-Y7204) foram pré-cultivadas individualmente em incubadora orbital (New Lab NL-343-002), a 180 rpm e 30 °C, por 24 horas, em 5 mL de meio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), composto por extrato de levedura (1%), peptona (2%) e glicose (2%) (p/v) (Silvello *et al.*, 2023).

Os inóculos foram obtidos a partir das células recuperadas por centrifugação a 2600 x g por 15 minutos, lavadas com solução salina estéril a 0,85% e ressuspensas no meio de fermentação, na concentração celular inicial de 0,5 g/L (Palladino *et al.*, 2021).

Quatro tipos de ensaios fermentativos foram avaliados: (1) Y904 por 72 horas; (2) Y7204 por 96 horas; (3) co-cultura simultânea Y904 + Y7204 por 96 horas; e (4) co-cultura sequencial, inicialmente com Y904 e adição de Y7204 após 24 horas, com duração total de 120 horas. Para as fermentações, os hidrolisados (10 mL) da hidrólise em batelada alimentada, apenas das biomassas pré-tratadas, foram autoclavados a 11°C e 0,5 atm por 15 minutos, suplementados com extrato de levedura (3%) e colocados em frascos Erlenmeyer de 50 mL. Os frascos foram tampados com rolhas de algodão hidrofóbico e gaze esterilizados e incubados a 30 °C e 180 rpm, durante 72, 96 e 120 horas, conforme a estratégia de fermentação, em triplicatas (Palladino *et al.*, 2021).

Os ensaios foram monitorados pela retirada de alíquotas de 1 mL das amostras nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, conforme o tempo total de cada ensaio. Após a cada fermentação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2600 xg, filtradas em Millipore® (0,20 µm, Chromafil® Xtra CA-20/25) e analisadas por HPLC para determinar os teores de açúcares, etanol, ácidos orgânicos, FF e HMF (Rodrigues *et al.*, 2022).

4.5.1 Cálculo dos parâmetros fermentativos

Os parâmetros de fermentação foram calculados considerando a concentração inicial de dos açúcares e a concentração de etanol produzido (Palladino *et al.*, 2021). O consumo de glicose e/ou xilose (%) foi calculado como a porcentagem dos açúcares consumidos a partir da concentração inicial). O rendimento ($Y_{p/s}$) foi calculado utilizando a Equação 13, em que P_f é a massa final de etanol (g/g), P_i é a massa inicial de etanol (g/g), S_i é a massa inicial de açúcar (g/g) e S_f a massa final de açúcar (g/g).

$$Y_{P/S(g/g)} = \frac{(Pf - Pi)}{(Si - Sf)} \quad (13)$$

A produtividade (Q_P) foi calculada por meio da Equação 14, em que Pf é a concentração final de etanol (g/L), Pi é a concentração inicial de etanol (g/L) e t é o tempo de fermentação.

$$Q_{P(g.L.h)} = \frac{(Pf - Pi)}{t} \quad (14)$$

A eficiência da fermentação ($\eta\%$) foi calculada por meio da Equação 15, dividindo-se o $Y_{p/s}$ experimental (g/g) pelo $Y_{p/s}$ teórico (0,511 g/g) e multiplicando o resultado por 100%.

$$\eta\% = \frac{Y_P}{S^{(teórico)}} \times 100\% \quad (15)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das biomassas

5.1.1 Composição química das biomassas

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* apresentou 43,11% de celulose, 23,30% de hemicelulose, 26,56% de lignina, 0,60% de cinzas, 5,46% de extrativos e 8,26% de umidade (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com Imman *et al.* (2021), que observaram 37,2% de celulose, 22,1% de hemicelulose, 26,5% de lignina, além de 8,2% de cinzas, 6% de extrativos e 5% de umidade. De maneira similar, Ávila, Forte e Goldbeck (2018) observaram 44,32% de celulose, 30,28% de hemicelulose, 23,85% de lignina, além de 2,46% de cinzas, 2,48% de extrativos e 8% de umidade no bagaço de cana bruto. Carvalho *et al.* (2020) também relataram valores próximos dos componentes principais no bagaço de cana bruto (41,3% de celulose, 21,6% de hemicelulose, 20,2% de lignina, além de 4,9% de cinzas, 4,9% de extrativos e 10% de umidade).

No sabugo de milho *in natura*, observou-se 31,76% de celulose, 37,27% de hemicelulose, 18,01% de lignina, 0,55% de cinzas, 5,87% de extrativos e 8,50% de umidade

(Tabela 1). Estes valores estão condizentes com Singh e Sawarkar (2021), que reportaram 36,42% de celulose, 39,81% de hemicelulose, 16,76% de lignina, além de 10,93% de cinzas, 6,98% de extrativos e 7,63% de umidade no sabugo bruto. Da mesma forma, Samomssa *et al.* (2024) identificaram 29,97% de celulose, 44,66% de hemicelulose, 15,57% de lignina, 2,13% de cinzas, 2,03% de extrativos e 7,03% de umidade em sabugo de milho bruto. Fornazier *et al.* (2024) também observaram teores similares (33,12% de celulose, 35,15% de hemicelulose e 15,59% de lignina) em SI.

Estes dados indicam que a composição química das biomassas brutas está de acordo com a literatura, com pequenas variações em alguns componentes minoritários. Segundo Wu *et al.* (2022) e Bhatia *et al.* (2020), variações na composição da biomassa *in natura* dependem de fatores como origem, idade, estágio de maturação, condições climáticas, métodos de colheita e armazenamento.

Tabela 1: Composição química (%) do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BI), bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BT), sabugo de milho *in natura* (SI) e sabugo de milho pré-tratado (ST).

Composição (%)	BI	BT	SI	ST
Celulose	43,11±0,13	70,80±0,81	31,76±0,76	69,32±0,71
Hemicelulose	23,30±0,71	21,57±0,12	37,27±0,81	24,14±0,39
Lignina Klason Total	26,56±0,48	18,85±0,18	18,01±0,44	9,12±0,95
Cinzas	0,60±0,03	0,05±0,01	0,55±0,04	0,04±0,03
Teor de Extrativos	5,46±0,09	-	5,87±0,06	-
Umidade	8,26±0,46	7,74±0,20	8,50±0,43	7,83±0,25
Deslignificação	-	65,50±0,01	-	73,50±0,63
Balanço de Massa	107,29±0,31	119,01±0,26	101,96±0,42	110,45±0,46

Fonte: Autora.

Após o pré-tratamento alcalino, BT apresentou 70,80% de celulose, 21,57% de hemicelulose, 18,85% de lignina, além de 0,05% de cinzas e 7,74% de umidade, com 65,50% de deslignificação (Tabela 1). Estes resultados podem ser comparados com Oladi e Aita (2017), que avaliaram diferentes temperaturas e tempos de reação no pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com NH₄OH (28%), variando entre 160–220 °C e 30–60 minutos. Estes autores observaram remoções de lignina entre 35,96 e 66,85%, com a maior solubilização registrada em torno de 180 °C. Shi *et al.* (2019b) relataram taxas variáveis de deslignificação no bagaço de cana tratado com NH₄OH entre 49,34 a 77,46%, sendo que o maior valor também foi obtido a 180 °C, da mesma forma que no presente trabalho. Jiménez *et al.* (2020) também utilizaram NH₄OH (10%) no pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar e relataram teores de hemicelulose

e lignina próximos aos deste estudo (27,11 e 14,73%, respectivamente), com deslignificação máxima de 46,30%, além de um aumento no teor total de carboidratos de 8,5%. Da mesma forma, Kusmiyati *et al.* (2019) observaram que o tratamento da biomassa de palmeira-do-açúcar com solução de NH_4OH a 10% resultou em teores de 36,70% de celulose, 22,61% de hemicelulose e 17,85% de lignina, o que corresponde a uma deslignificação de 26,39%.

Para ST, observou-se 69,32% de celulose, 24,14% de hemicelulose, 9,12% de lignina, com alta taxa (73,5%) de deslignificação (Tabela 1). Estes dados estão de acordo com estudos prévios que reportam elevada remoção de lignina em subprodutos de milho pré-tratados por NH_4OH (Du *et al.*, 2018), com aumentos proporcionais na fração celulósica (Gandam *et al.*, 2022). Qin *et al.* (2013) aplicaram NH_4OH a 20% na palha de milho e também encontraram resultados semelhantes (57,9% de celulose, 19,7% de hemicelulose e 8,7% de lignina). Além disso, o estudo também relata que a temperatura de 180 °C foi a condição ótima para atingir a deslignificação máxima. Já Zhang e Wu (2021) observaram uma composição ligeiramente variável em sabugo de milho tratado com NH_4OH (45,17% de celulose, 35,16% de hemicelulose e 4,85% de lignina), porém com uma taxa de deslignificação similar (75,5%). Estas variações podem ser atribuídas às condições empregadas: concentração de NH_4OH (11,6% p/p), 20% (p/v) de sólidos e tempo de reação prolongado (8,8 h). De acordo com Xu, Li e Mu (2016), concentrações de NH_4OH acima de 20% (p/p) e 10% (p/v) de sólidos, combinadas a altas temperaturas e tempos de reação curtos, promovem alta deslignificação da biomassa (Avci *et al.*, 2019; Sipponen e Österberg, 2019). Dessa forma, o uso de NH_4OH tem mostrado elevada eficiência na remoção seletiva de lignina e hemicelulose, preservando a celulose (Isci *et al.*, 2008; Johannes e Xuan, 2024). Portanto, os dados do presente estudo mostram que o pré-tratamento com NH_4OH , nas condições empregadas, foi eficiente na remoção de lignina tanto em BT quanto em ST, promovendo um aumento proporcional na fração celulósica e contribuindo para o ataque enzimático à matriz polissacarídica na etapa seguinte de sacarificação. Esta alta taxa de deslignificação pode ser devida à reação da amônia (NH_3) com a água, formando íons amônio e hidroxila, que rompem ligações éster na estrutura lignina-carboidrato (Kusmiyati *et al.*, 2019). Esse processo aumenta a área superficial e a porosidade da biomassa, além de reduzir o grau de polimerização devido à alta temperatura utilizada (Malik *et al.*, 2022).

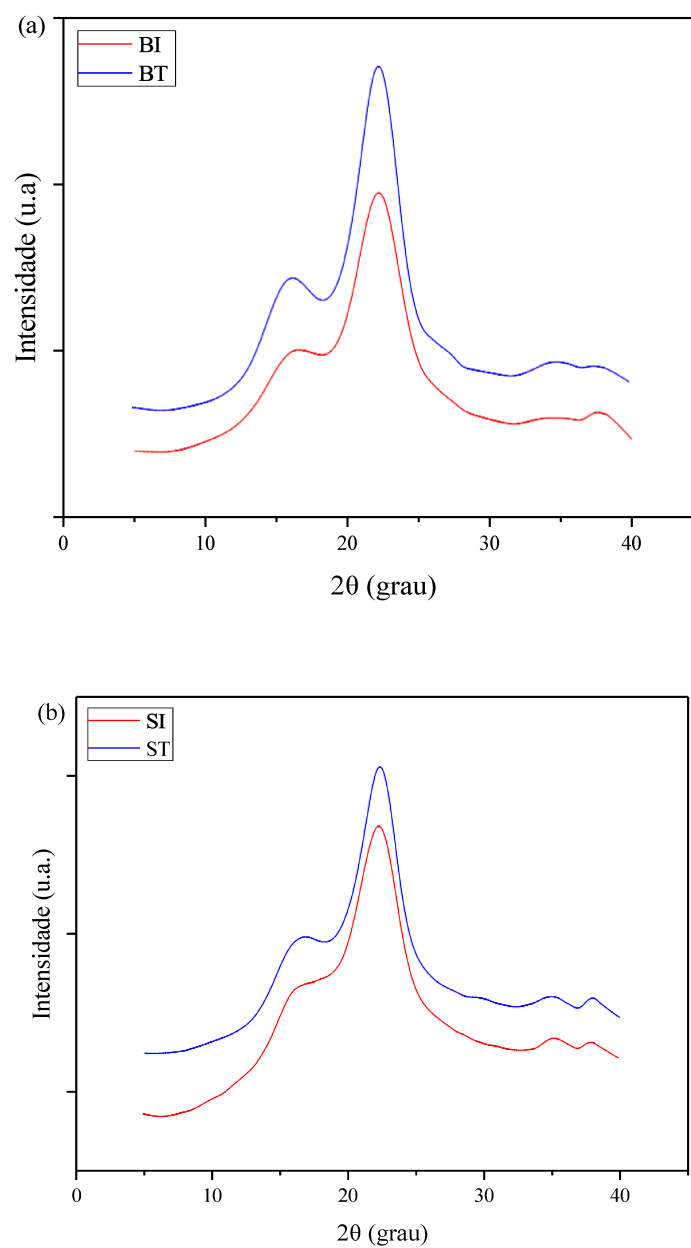
5.1.2 Difractometria de Raios-X (DRX)

A técnica de difração de raios-X é amplamente empregada como método analítico para identificar e quantificar estruturas cristalinas, além de avaliar as propriedades de diferentes materiais (Bekas *et al.*, 2016). A análise dos difratogramas das biomassas do bagaço de cana-de-açúcar e do sabugo de milho revelou a presença de picos distintos em torno de 18° e $22,5^\circ$, característicos da estrutura de celulose tipo I, indicando a presença desse polímero nas amostras (Figura 7). Na celulose tipo I, as cadeias poliméricas se organizam paralelamente, estabilizadas por ligações de hidrogênio, formando arranjos ordenados e parcialmente cristalinos, com picos cristalinos em torno de 2θ entre 22° e 23° , enquanto o halo amorfo é observado entre 2θ de 18° e 19° (Nam *et al.*, 2016).

Esta análise mostrou também um índice de cristalinidade de 69,84% em BT, em comparação com o de 63,27% em BI. De modo semelhante, ST alcançou 63,17%, enquanto SI apresentou 55,34% (Tabela 2). Estes dados corroboram estudos anteriores com pré-tratamentos alcalinos, como os de Chandel *et al.* (2013), que reportaram um aumento na cristalinidade do bagaço de cana tratado com NH_4OH , de 50,5 para 65,75%. Da mesma forma, Zhang *et al.* (2023) observaram um aumento de 48,3 para 60,3% na cristalinidade do bagaço de cana tratado com NaOH . Em biomassas de milho, resultados semelhantes foram observados por Zhang *et al.* (2021), que relataram elevação na cristalinidade de 46,56 para 56,02% em talos de milho tratados com NH_4OH , enquanto Zhu *et al.* (2018) verificaram um aumento de 53,2 para 55,1% na palha de milho pré-tratada.

De acordo com Merrettig-Bruns e Sayder (2016), o tratamento com NH_4OH influencia a cristalização da celulose, dependendo das condições de temperatura e tempo de pré-tratamento. Nesse sentido, temperaturas acima de 130°C promovem maior grau de cristalização, devido à remoção das frações amorfas presentes na lignina e na hemicelulose. Dessa forma, a remoção de lignina e hemicelulose contribui significativamente para o aumento da cristalinidade da biomassa após o pré-tratamento (Kim e Lee 2005; Jang, Jeong e Choi, 2023). Portanto, o aumento na cristalinidade, observado tanto em BT quanto SI, pode ser devido principalmente à remoção das frações amorfas durante o pré-tratamento alcalino.

Figura 7: Difratogramas de raios-X das biomassas avaliadas: (a) BI e BT. (b) SI e ST.



Fonte: Autora.

Tabela 2: Índice de cristalinidade (I_{CR}) das biomassas.

Amostras	I_{CR} (%)
BI	63,27
BT	69,84
SI	55,34
ST	63,17

Fonte: Autora.

No entanto, o alto índice de cristalinidade pode reduzir a quantidade de carboidratos acessíveis às enzimas, comprometendo a eficiência hidrolítica (Ethaib, 2024). Por outro lado, uma biomassa com elevado índice de cristalinidade não necessariamente resulta em menor ação enzimática, pois o aumento da cristalinidade pode estar relacionado a uma maior organização e compactação das cadeias de celulose (Wang *et al.*, 2024). Além disso, embora seja comumente utilizado como uma análise empírica que indica a proporção relativa das regiões cristalinas e amorfas, o índice de cristalinidade abrange não somente a fração celulósica, mas também outros componentes (Salem *et al.*, 2023).

5.1.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho baseia-se nas vibrações e rotações de uma molécula, permitindo a análise de sua composição (Giraldo e Marin, 2025). Nos espectros vibracionais obtidos por FTIR das amostras brutas, observaram-se bandas de absorção características das vibrações das ligações de hidrogênio dos grupos hidroxila (OH), presentes na celulose, localizadas na região de 3600 a 3200 cm^{-1} (Figura 8). Entre 3000 e 2700 cm^{-1} , observaram-se bandas atribuídas aos estiramentos das ligações carbono-hidrogênio (C-H) em cadeias alifáticas. Além disso, bandas entre 1700 e 1500 cm^{-1} foram observadas, sugerindo a presença de grupos aromáticos característicos da lignina e de compostos fenólicos. Na faixa de 1300 a 800 cm^{-1} , foram identificadas bandas associadas a grupos funcionais da hemicelulose, enquanto os picos detectados entre 875 e 930 cm^{-1} estão relacionados ao estiramento das ligações glicosídicas de celulose e hemicelulose. Estes resultados corroboram a literatura, indicando que os picos encontrados são característicos de biomassas lignocelulósicas (Chen *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2024; Ponce *et al.*, 2021).

Tabela 3: Bandas de absorbância no FTIR típicas de biomassas lignocelulósicas. Adaptado de Li *et al.* (2018); Xu; Wang (2015).

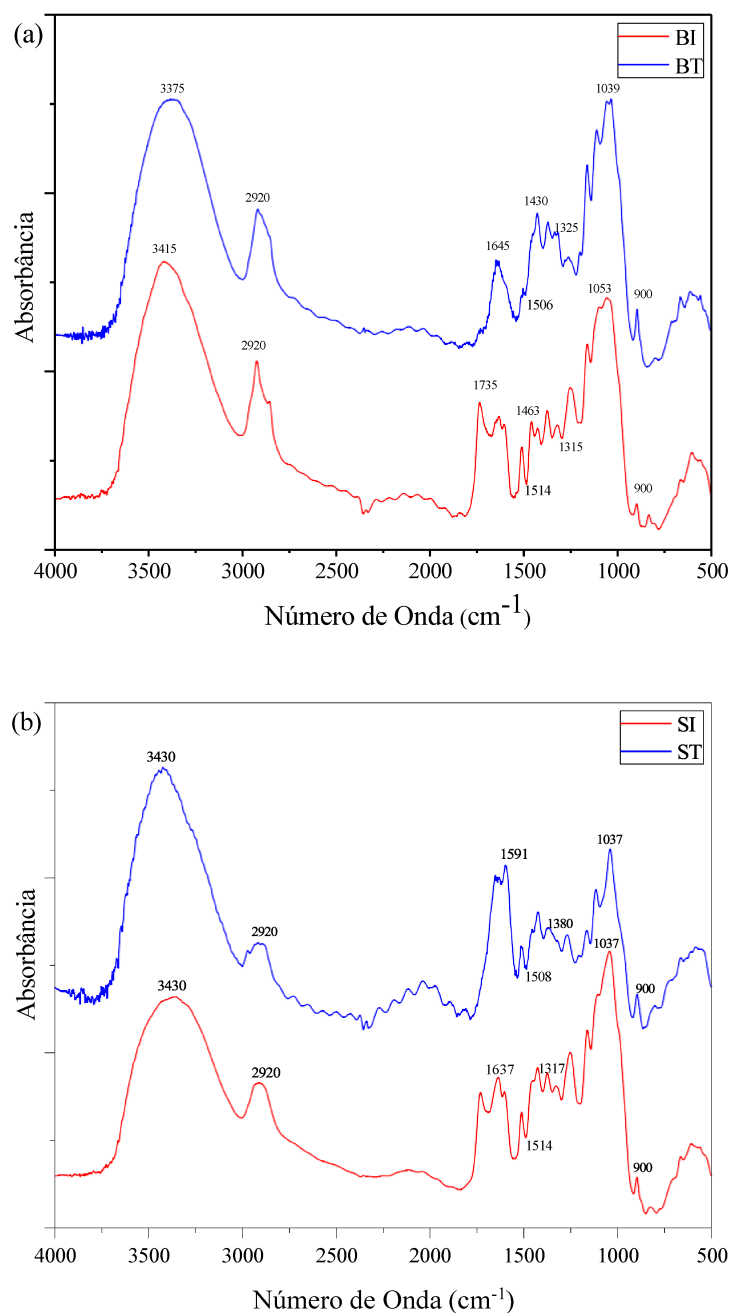
Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional
3600-3200	Estiramento das Hidroxilas (OH)
3000-2700	Estiramento de Ligações Alifáticas (C-H)
1730	Estiramento de Grupos Éster
1700-1500	Estiramento de Ligações Aromáticas (C=C)
1500-1380	Deformação das Ligações C-H
1300-800	Deformação de Ligações C-O e C-C
875-930	Estiramento de Ligações Glicosídicas de Celulose e Hemicelulose

Fonte: Autora.

Nas biomassas pré-tratadas com NH_4OH , observou-se a ausência de picos na faixa de 1700 a 1500 cm^{-1} , juntamente com o declínio dos picos existentes, indicando a remoção da lignina (Figura 8). Além disso, houve uma redução nos picos associados à hemicelulose, o que confirma a quebra de suas ligações e a eficiência do tratamento. Por outro lado, a presença de picos entre 1300 e 800 cm^{-1} indica que a estrutura da celulose foi preservada. Estes dados estão em conformidade com a literatura, que relata que o tratamento alcalino promove a quebra das ligações entre os grupos funcionais da hemicelulose e os componentes da lignina. Esse processo favorece a separação da matriz celulósica e contribui para a desorganização da estrutura do complexo celulose-hemicelulose, evidenciando a deslignificação através da redução da lignina (Rastogi; Shrivastava, 2023; Thite; Nerurkar, 2019). Resultados semelhantes foram obtidos por Zhu *et al.* (2021) e Kumar *et al.* (2024), que realizaram pré-tratamento de bagaço de cana com NaOH e observaram o desaparecimento de picos nas faixas de 1700 a 1500 cm^{-1} e de 1300 a 800 cm^{-1} , indicando a quebra das ligações na lignina.

Nas amostras pré-tratadas, foram observadas também bandas na faixa de 875 a 930 cm^{-1} , associadas às ligações glicosídicas presentes na celulose e na hemicelulose. O aparecimento ou o aumento da intensidade dessas bandas pode indicar a liberação ou exposição de grupos funcionais desses polissacarídeos, sendo esse pico (875 a 930 cm^{-1}) também característico do aumento da celulose amorfa, resultado das alterações estruturais provocadas pelo pré-tratamento alcalino (Gunam *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2024). Além disso, observou-se uma intensificação na faixa de 2700 a 3000 cm^{-1} , atribuída à remoção de compostos complexos e de ligações alifáticas que, anteriormente, mascaravam os grupos funcionais presentes nas biomassas brutas (Yang *et al.*, 2023). Contudo, a presença ou intensidades dessa banda indica a liberação ou exposição de grupos funcionais (Gunam *et al.*, 2020). Estes resultados estão em concordância com Joy *et al.* (2021) e Li *et al.* (2024), que demonstraram que o pré-tratamento com NH_4OH remove parcialmente a lignina e a hemicelulose, sugerindo a diminuição da estrutura recalcitrante das biomassas analisadas (Thite; Nerurkar, 2019).

Figura 8: Espectros de FTIR das biomassas: (a) BI e BT. (b) SI e ST.



Fonte: Autora.

5.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

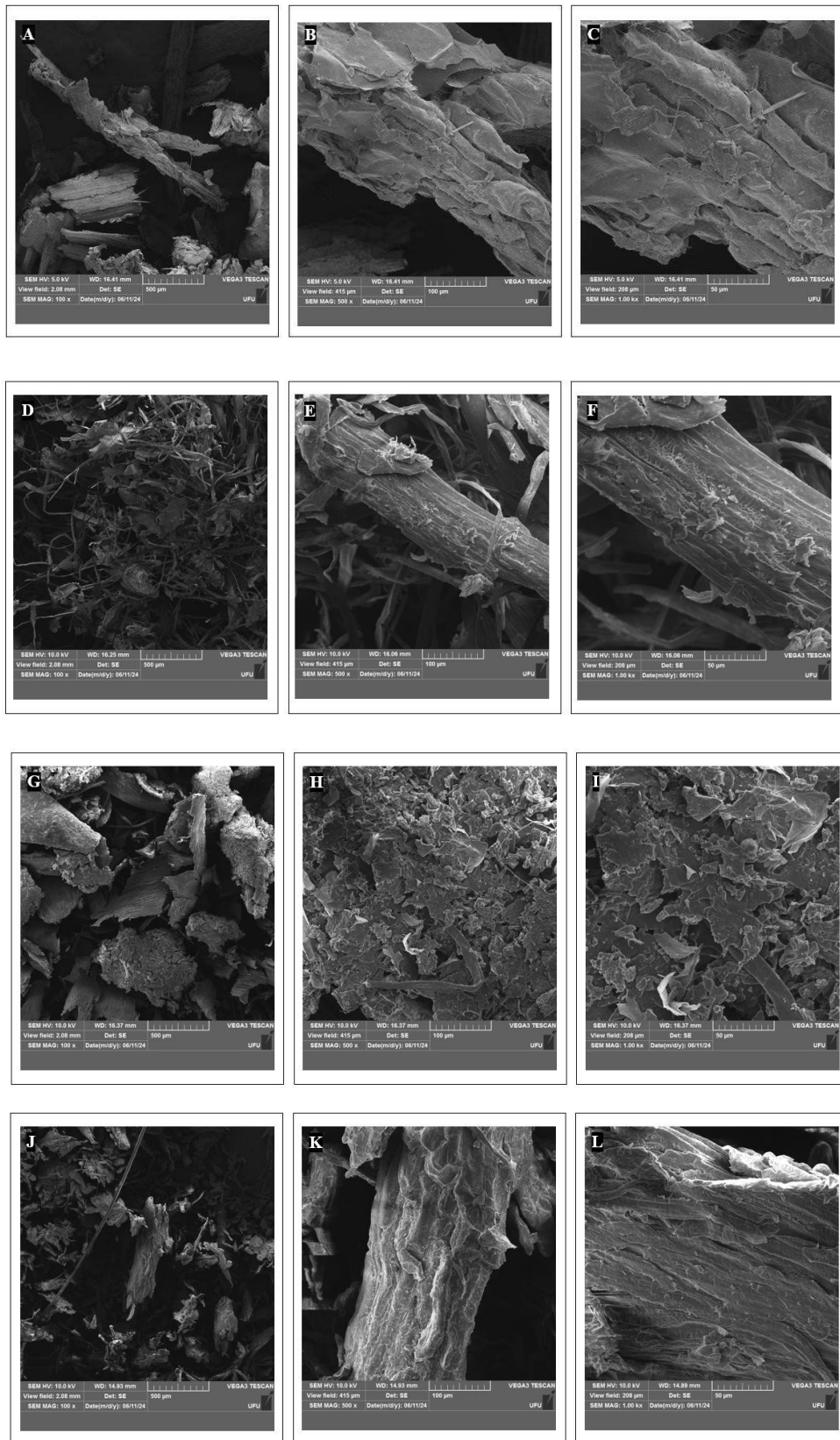
As micrografias evidenciaram variações nas superfícies das biomassas pré-tratadas em comparação às amostras *in natura* (Figura 9). Em BI e SI, foi observada uma morfologia compacta e rígida, refletindo a integridade estrutural das amostras brutas (Athira, Bahurudeen e Appari, 2021). Essa rigidez é atribuída à lignina, que atua como uma camada protetora à

estrutura fibrosa, associada à presença de ácidos graxos e ceras (Hernandez, Ferreira e Rosa, 2018).

Nas amostras pré-tratadas, foram observados poros na superfície, com aumentos na área superficial, atribuídos à deslignificação (Cao; Aita, 2013). Além disso, BT e ST apresentaram estruturas mais lisas e fibrosas, resultantes da exposição à celulose. Este aumento na porosidade pode ser devido à remoção parcial da hemicelulose e da lignina, tornando as fibras mais acessíveis e contribuindo para a digestibilidade na etapa seguinte de hidrólise enzimática (Junior *et al.*, 2013). Alterações semelhantes foram encontradas em palha de arroz, bagaço de cana e palha de milho pré-tratados com NaOH e NH₄OH, evidenciando a eficiência dos métodos alcalinos na desestruturação de lignoceluloses (Hernandez *et al.*, 2018; Ko *et al.*, 2009).

Estes dados indicam que o pré-tratamento com amônia desempenhou um papel importante na modificação estrutural das biomassas, promovendo uma maior exposição das fibras celulósicas à sacarificação (Hans *et al.*, 2021). Essa melhoria está associada à remoção parcial da lignina, à desconstrução da estrutura interna das microfibrilas de celulose, ao aumento da área de superfície e à maior flexibilidade da fibra (He *et al.*, 2018).

Figura 9: Micrografias eletrônicas das superfícies das biomassas em diferentes ampliações: (A, B, C) BI. (D, E, F) BT. (G, H, I) SI. (J, K, L) ST.



Fonte: Autora.

5.2 Hidrólise enzimática

Na hidrólise enzimática em batelada convencional, as biomassas brutas apresentaram concentrações de ART de 10,34 e 12,77 g/L para BI e SI, respectivamente. Nos hidrolisados de BT e ST, a concentração de ART atingiu 19,29 e 29,58 g/L, com aumentos significativos de 86,57 e 131,58 % em relação às biomassas brutas, respectivamente (Figura 10a). Estes dados demonstram o efeito positivo do pré-tratamento com NH_4OH na liberação de açúcares, devido principalmente à elevada taxa de deslignificação nas amostras pré-tratadas, especialmente no sabugo de milho, e reforçam o papel essencial dessa etapa em bioconversões (Mohammadi *et al.*, 2024).

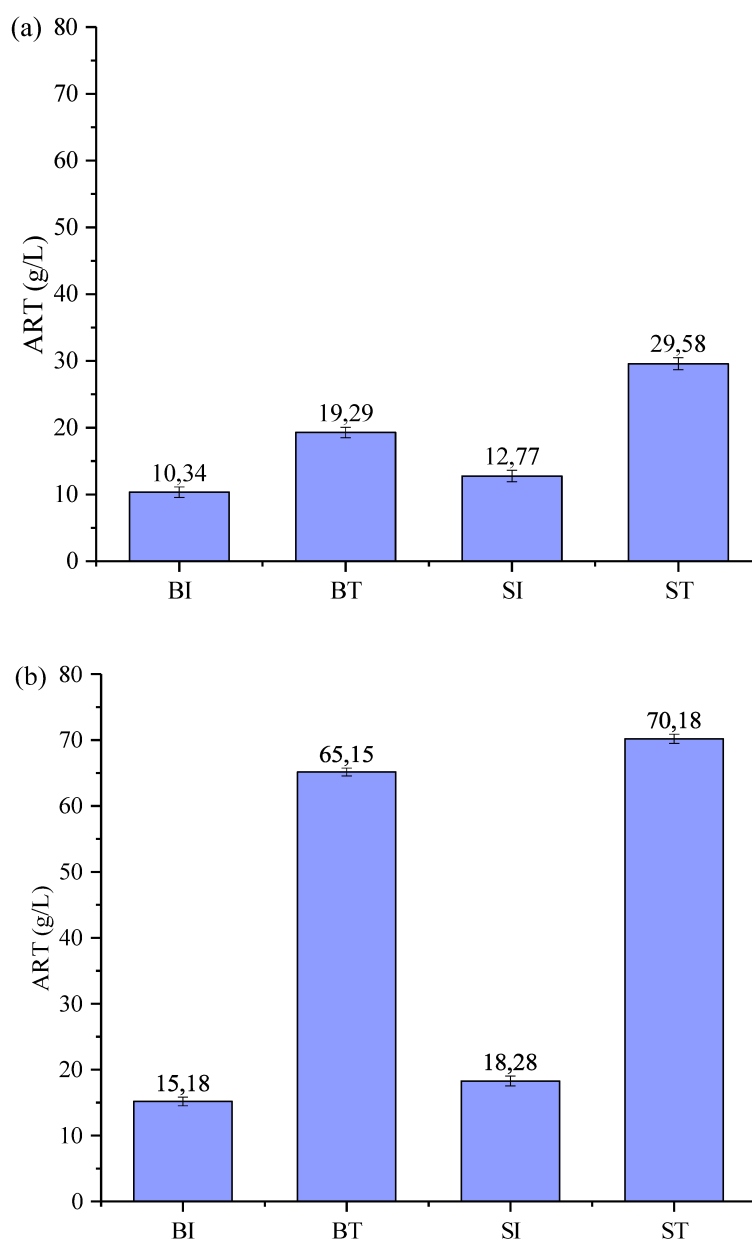
Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram o impacto benéfico do pré-tratamento alcalino na hidrólise enzimática (Shi *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021). Por exemplo, Ascencio *et al.* (2020) relataram 32,82 g/L de ART em hidrolisados de bagaço de cana pré-tratado com NaOH, utilizando 15 FPU de Cellic CTec2 /g de celulose, com aumento de 68,78% em relação à biomassa *in natura*. Tsai *et al.* (2018) realizaram sacarificações do capim-napier submetido a pré-tratamentos com H_2SO_4 e NaOH, utilizando 12 FPU de Cellic CTec2 /g de celulose e observaram um aumento de 75,4% no rendimento de glicose, indicando desempenho superior na sacarificação da biomassa tratada com álcali devido à remoção seletiva da lignina e da hemicelulose (Broda, Yelle e Serwańska, 2022; Hans *et al.*, 2021).

Outro fator que interfere na obtenção de açúcares fermentescíveis é a carga de biomassa (Speight, 2020). Neste sentido, sacarificações com altas cargas de sólidos têm sido conduzidas a fim de melhorar o desempenho hidrolítico (Dey *et al.*, 2022; Gong *et al.*, 2020). No entanto, a alta concentração de substrato torna a mistura difícil, comprometendo a transferência de massa e calor, e consequentemente, a eficácia da hidrólise (Silva *et al.*, 2016). Como estratégia, sacarificações em batelada alimentada com cargas de sólidos acima de 15% têm sido empregadas para aumentar o rendimento em açúcares (Kim *et al.*, 2019). Nesse processo, o substrato é adicionado gradualmente, mantendo o conteúdo de sólidos relativamente baixo no início, mas atingindo altas cargas ao longo do tempo (Li *et al.*, 2024). Essa estratégia tem se mostrado economicamente viável para obtenção de altos teores de ART (Barreto *et al.*, 2025).

Neste sentido, no presente estudo, a hidrólise em batelada alimentada com 30% de biomassa resultou em 65,15 g/L de ART em BT e 70,18 g/L em ST, com aumentos de 238% (BT) e 137% (ST) quando comparados à sacarificação convencional (Figura 10b). Os dados

indicam ainda que o sabugo de milho pré-tratado apresentou maior eficiência hidrolítica em comparação ao bagaço de cana pré-tratado, possivelmente devido à maior taxa de designificação (Tabela 1). Jiménez *et al.* (2020) e Velmurugan *et al.* (2023), ao pré-tratar palha de cana-de-açúcar e sabugo de milho com NH_4OH , também observaram valores semelhantes (62,19 e 57,80 g/L, respectivamente).

Figura 10: Teores de açúcares redutores totais (ART) das biomassas *in natura* e pré-tratadas após hidrólise enzimática em batelada com 10% de sólidos (a) e em batelada alimentada com 30% de sólidos (b).



Fonte: Autora.

Outro fator relevante é o momento de adição da enzima. Estudos indicam que a aplicação da carga enzimática total no início do processo aumenta a produção de glicose, possivelmente devido ao modo de alimentação do sistema (Tareen *et al.*, 2021). Quando a hidrólise é conduzida com cargas superiores a 25%, a adição total da enzima no início do processo se torna preferível (Sugiharto *et al.*, 2016), observando-se maior eficiência hidrolítica devido à rápida redução da viscosidade da mistura, o que favorece a transferência de calor e massa (Cardona *et al.*, 2015). No presente estudo, foram observadas ainda altas concentrações de açúcares fermentescíveis, especialmente glicose e xilose, nos hidrolisados em batelada alimentada com 30% de sólidos (Tabela 4). Os teores de glicose e xilose foram semelhantes nos hidrolisados pré-tratados (43,75 e 41,63 g/L de glicose e 18,12 e 18,75 g/L de xilose em BT e ST, respectivamente), indicando a eficiente despolimerização da celulose e hemicelulose nessas biomassas (Galadima, Masudi e Muraza, 2022). Esta alta produção de glicose e xilose nas biomassas pré-tratadas deve-se à alta remoção da lignina, facilitando o acesso das enzimas e contribuindo para o aumento significativo na liberação desses monossacarídeos (Broda, Yelle e Serwańska, 2022; Hans *et al.*, 2021).

Tabela 4: Concentração de açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação após processo de hidrólise batelada alimentada em BT e ST.

Composto (g/L)	BT	ST
Celobiose	1,50±0,44	0,27±0,03
Glicose	43,75±1,40	41,63±0,84
Xilose	18,12±1,16	18,75±0,24
Arabinose	0,97±0,04	0,51±0,06
Ácido fórmico	0,04±0,02	ND
Ácido acético	0,07±0,05	ND
5-Hidroxi metilfurfural	0,02±0,01	0,03±0,01
Furfural	0,04±0,02	0,03±0,02

Fonte: Autora. **ND:** Não detectado

Por outro lado, os pré-tratamentos podem gerar subprodutos indesejáveis, como ácido fórmico, ácido acético, FF e HMF. Estes compostos são tóxicos não apenas para as enzimas utilizadas na hidrólise, mas também para as cepas microbianas envolvidas na fermentação alcoólica (Zhao *et al.*, 2022b). As concentrações desses inibidores dependem da composição da biomassa, do tipo de pré-tratamento aplicado, pH, temperatura e pressão (Huang *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2022). Esses compostos se originam da degradação da hemicelulose, que libera xilose, manose, ácido acético, galactose e glicose. Em condições de alta temperatura e pressão,

a xilose se converte em FF. De maneira semelhante, o HMF é derivado das hexoses. A decomposição do FF e do HMF leva à formação de ácido fórmico, enquanto o ácido levulínico resulta da transformação do HMF. Compostos fenólicos derivam principalmente da decomposição parcial da lignina, mas também podem ser produzidos durante a degradação de carboidratos (Baser, Chakraborty e Sharma, 2024; Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000; Świątek *et al.*, 2020). Neste estudo, baixas concentrações desses compostos foram detectadas nos hidrolisados, evidenciando a eficácia do pré-tratamento na redução da formação de subprodutos (Tabela 5), o que também minimiza a degradação dos açúcares (Kumar *et al.*, 2019).

Em concentrações elevadas (superiores a 3,0 g/L), os ácidos acético e fórmico podem exercer efeitos inibitórios significativos sobre a eficiência hidrolítica e alta toxicidade para o crescimento microbiano (Gomes *et al.*, 2022; Zeng *et al.*, 2022). Além disso, FF e HMF, em concentrações de 2 e 4 g/L, respectivamente, reduzem a eficiência da hidrólise enzimática e dificultam o crescimento e as atividades metabólicas dos microrganismos (Lyu *et al.*, 2025). Dessa forma, as condições de pré-tratamento e hidrólise influenciam significativamente a formação de compostos inibidores. Entretanto, o pré-tratamento alcalino se caracteriza por uma menor formação de inibidores, impactando positivamente a eficiência da hidrólise, ao contrário do que ocorre em tratamentos ácidos, nos quais se observa uma alta formação desses compostos (Panakkal *et al.*, 2021; Solarte-Toro *et al.*, 2020). Portanto, esses resultados demonstram que o pré-tratamento com NH_4OH produziu hidrolisados de BT e ST com baixas concentrações desses inibidores, ao mesmo tempo em que altas concentrações de açúcares fermentescíveis foram obtidas.

5.3 Fermentação alcoólica

Os hidrolisados de BT e de ST da sacarificação em batelada alimentada foram submetidos à fermentação alcoólica. Os resultados mostraram que *S. cerevisiae* Y904 consumiu completamente a glicose, enquanto a *S. passalidarum* Y7204 consumiu tanto glicose quanto xilose, com taxas de consumo variando de 65 a 100% e crescimento celular de 5,38 a 16,70 g/L (Tabela 6 e Figura 11). As concentrações de etanol variaram de 9,77 a 26,34 g/L, dependendo das condições da fermentação.

Com relação à Fermentação 1 (utilizando apenas *S. cerevisiae* Y904), foram produzidos valores máximos de 19,53 e 19,18 g/L de etanol em BT e ST em 24 horas de cultivo, sugerindo

alta eficiência fermentativa em ambos os hidrolisados, independentemente da biomassa (Tabela 6). Estes dados estão de acordo com alguns estudos prévios realizados com hidrolisados de bagaço de cana e sabugo de milho pré-tratados por métodos alcalinos. Por exemplo, Wang *et al.* (2019) relataram produção de 22,37 g/L de etanol, com rendimento de 0,67 g/g, produtividade de 0,93 g/L/h e eficiência de 67,50%, utilizando hidrolisado de bagaço de cana tratado com NaOH (contendo 48,18 g/L de glicose e 16,47 g/L de xilose no tempo zero) e *S. cerevisiae* Y2034. Da mesma forma, Fornazier *et al.* (2024) obtiveram 16,11 g/L de etanol, rendimento de 0,67 g/g, produtividade de 0,33 g/L/h e eficiência de 66,69% ao fermentar hidrolisado de sabugo de milho tratado com NaOH (47,05 g/L de glicose e 34,07 g/L de xilose) utilizando também *S. cerevisiae* Y904. Embora a glicose tenha sido completamente consumida, foram observadas variações nos rendimentos e nas produtividades em comparação com alguns dados da literatura. Por exemplo, Ramos *et al.* (2021) pré-trataram bagaço de cana-de-açúcar com sulfito alcalino (10% Na₂SO₃ e 5% NaOH), seguido por sacarificação enzimática com 17 FPU/g de glucanase proveniente de *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma-Aldrich), suplementada com celobiose NS50012 (Novozymes) na concentração de 4 UI/g de bagaço. A fermentação conduzida com a cepa *S. cerevisiae* GI alcançou um rendimento de 0,40 g/g, produtividade de 1,58 g/L/h, eficiência de 79% e concentração final de etanol de 38 g/L. Esta divergência pode estar relacionada à condição de sacarificação, na qual dois tipos de enzimas comerciais foram utilizadas, o que pode ter refletido em um elevado conteúdo de açúcares nestes hidrolisados e, conseqüentemente, em etanol.

Variações nos rendimentos podem também ser devidas a outros fatores, tais como: como inibição pelo produto final (etanol), ácidos orgânicos, FF, HMF, concentração de açúcares, pressão osmótica, tamanho do inóculo, aeração, estresse oxidativo e térmico (Bai, Anderson e Moo-Young, 2008; Laopaiboon *et al.*, 2009; Zentou *et al.*, 2021). Além disso, a otimização de parâmetros, como pH, temperatura e aeração, aliada à suplementação do hidrolisado com extrato de levedura, também pode influenciar a eficiência fermentativa (AbdElhafez *et al.* 2022; Nadeem *et al.*, 2015). Entretanto, no presente estudo, os hidrolisados não apresentaram níveis significativos de compostos inibitórios (Tabela 5), reforçando a eficiência do pré-tratamento aplicado e o potencial desses hidrolisados pré-tratados em processos fermentativos.

Tabela 5: Produção de etanol a partir de hidrolisados de BT e ST por *S. cerevisiae* Y904 e *S. passalidarum* Y7204.

Fermentação	Levedura	Hidrolisado	Consumo de glicose ¹ (%)	Consumo de xilose ¹ (%)	Consumo médio de açúcares ² (%)	Células (g/L)	Etanol (g/L)	$Y_{p/s}^{EtOH}$ ³ (g/g)	η^{EtOH} ⁴ (%)	Q_p^{EtOH} ⁵ (g/L/h)	Tempo ⁶ (h)
1	Y904	BT	100	0	50	12,97±0,32	19,53±1,77	0,45±0,04	88	0,81±0,07	24
		ST	100	0	50	6,92±0,49	19,18±1,63	0,49±0,09	88	0,87±0,14	24
2	Y7204	BT	100	100	100	16,70±0,24	21,35±0,99	0,30±0,00	60	0,89±0,51	24
		ST	100	82	93	5,38±0,96	26,34±0,59	0,44±0,01	87	1,10±0,02	24
3	Y904+Y7204	BT	100	69	93	16,70±1,13	20,00±0,16	0,32±0,01	62	0,83±0,01	24
		ST	89	43	65	8,49±0,17	16,95±3,00	0,33±0,04	64	0,71±0,13	24
4	Y904-7204-24H	BT	100	84	91	11,03±0,90	11,76±0,11	0,27±0,01	53	0,49±0,00	24
		ST	100	46	81	14,73±0,04	9,77±1,17	0,23±0,02	50	0,41±0,05	24

Fonte: Autora.¹consumo dos açúcares (%) – percentual do açúcar inicial consumido;² consumo médio dos açúcares (%) – percentual dos açúcares (glicose e xilose) consumidos³ $Y_{p/s}^{EtOH}$ (g/g) – teor de etanol: correlação entre etanol (ΔP) produzido com açúcar (ΔS) consumido (rendimento do etanol à base do açúcar total consumido);⁴ η^{EtOH} (%) – eficiência de conversão: percentual do rendimento máximo teórico do etanol (0,511 g de etanol por g de xilose);⁵ Q_p^{EtOH} (g/L/h) – produtividade do etanol: relação entre concentração de etanol (g/L) e tempo (h) (em misturas de xilose/glicose, produtividade do etanol calculada para cada período de consumo de açúcar);⁶Tempo de fermentação considerado para cálculos;⁶Tempo de produção máxima de etanol (g/L).

Na fermentação 2 (conduzida com *S. passalidarum* Y7204), observou-se a maior eficiência fermentativa, resultando em 21,35 e 26,34 g/L de etanol para BT e ST, respectivamente. Comparando as biomassas, a fermentação do hidrolisado de ST também apresentou rendimentos e produtividades superiores (0,44 g/g e 0,30 g/L/h, respectivamente) a BT. Esses resultados estão condizentes com a caracterização e a sacarificação previamente realizadas, que demonstraram maior taxa de deslignificação e maior produção de açúcares para o sabugo de milho pré-tratado (Tabelas 1, 4 e Figura 10). Resultados semelhantes foram obtidos por Nakanishi *et al.* (2017) após ensaios fermentativos de hidrolisados de BT pré-tratados com NaOH e antraquinona (42,9 g/L de glicose e 14,9 g/L de xilose no tempo inicial) com *S. passalidarum* Y-27907, obtendo-se 23,3 g/L de etanol, rendimento de 0,45 g/g, produtividade de 0,81 g/L/h e eficiência de 90%. Souza (2022) utilizou a mesma linhagem Y7204 na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, obtido por hidrólise com H₂SO₄ (4,6 g/L de glicose e 57,5 g/L de xilose), produzindo 19,4 g/L de etanol, rendimento de 0,28 g/g, produtividade de 0,27 g/L/h e eficiência de 53,2%. Estudos com meios sintéticos também corroboraram a eficácia dessa levedura. Campos *et al.* (2022) relataram a produção de 25,21 g/L de etanol em meio sintético contendo 40 g/L de glicose, fermentado com *S. passalidarum* NRRL Y-27907, alcançando rendimento de 0,28 g/g, produtividade de 0,36 g/L/h e eficiência de 55%. Essas comparações corroboram a eficácia do método proposto no presente estudo, com alta produtividade e rendimento de etanol em ST utilizando Y7204, indicando desempenho superior desta linhagem nas condições testadas. Esses resultados são importantes, pois este é primeiro relato na literatura sobre fermentação de hidrolisados enzimáticos de sabugo de milho pré-tratados com NH₄OH utilizando *S. passalidarum*. Além disso, a concentração de etanol e os parâmetros fermentativos obtidos são superiores a esses estudos prévios envolvendo esta espécie em fermentações com outras biomassas e condições de pré-tratamento e hidrólise.

Apesar dos altos rendimentos em 24h de cultivo, após este período a produção de etanol diminuiu. Este resultado pode ser devido ao processo de co-fermentação de hexoses e pentoses. Em co-fermentações, o consumo simultâneo de glicose e xilose por *S. passalidarum* é influenciado pelos níveis de oxigênio no meio de cultura (Hou, 2012). Além disso, a presença de glicose inibe a metabolização da xilose por *S. passalidarum*, reduzindo a expressão de genes e a atividade das enzimas xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xiluloquinase (XK), o que diminui a eficiência fermentativa (Ribeiro *et al.*, 2021; Campos *et al.*, 2022). Dessa forma, durante a cofermentação, a captação e o metabolismo de pentoses podem ser suprimidos (Hou, 2012). Os meios de fermentação contendo glicose e xilose se comportaram como uma

combinação dos meios de fermentação contendo cada carboidrato isoladamente. Porém, os meios com maior proporção de glicose produziram mais biomassa, enquanto aqueles com maior concentração de xilose apresentaram maiores rendimentos de etanol (Guzmán *et al.*, 2024).

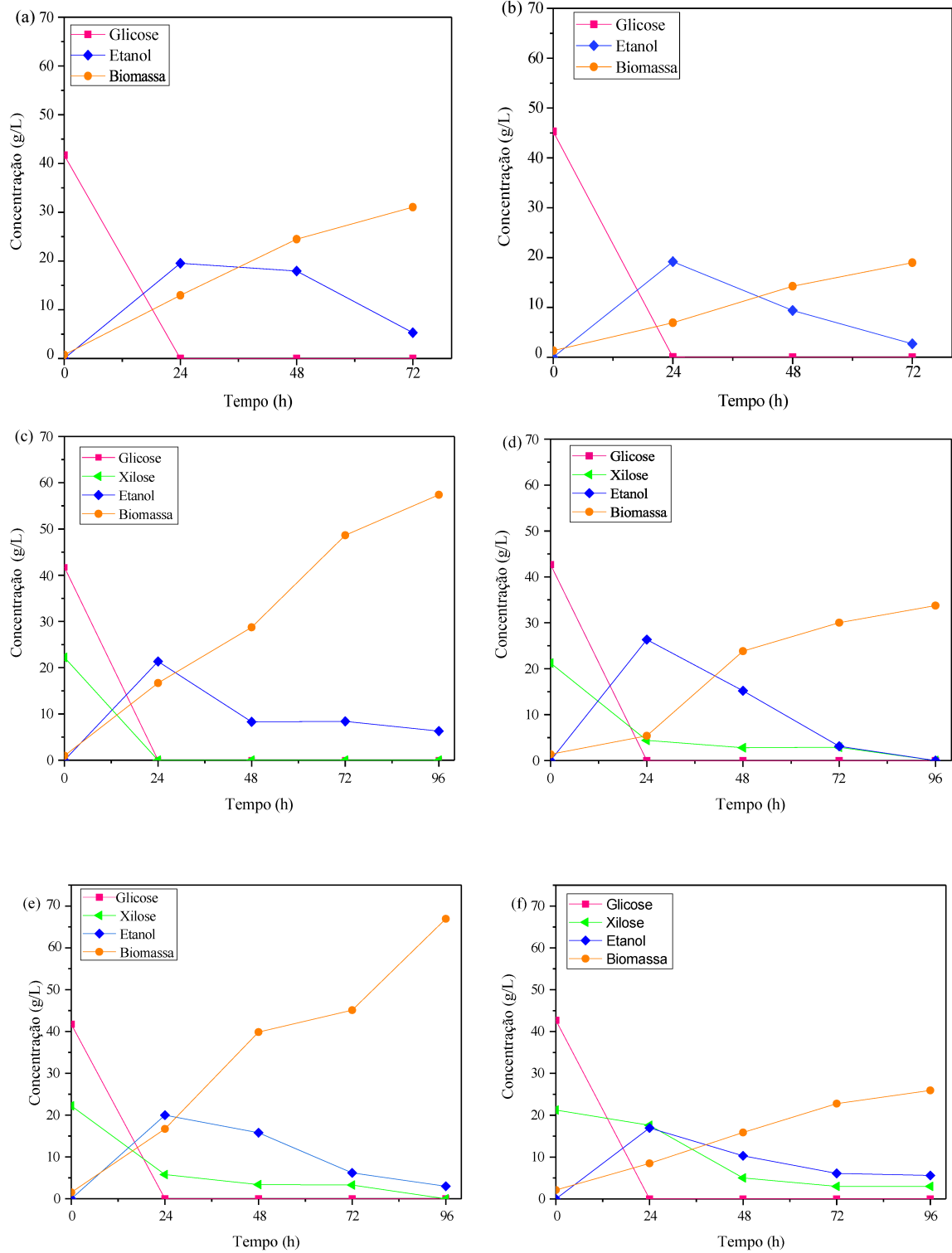
Outra estratégia para aumentar a produção de etanol 2G é o co-cultivo de leveduras, maximizando assim o consumo de glicose e xilose. Estudos indicam que o co-cultivo de *S. cerevisiae* com leveduras fermentadoras de pentoses pode aumentar a produção de etanol, possivelmente devido à utilização mais eficaz do substrato (Rech *et al.*, 2024; Ritika *et al.*, 2023). Neste sentido, na Fermentação 3, conduzida em co-cultivo simultâneo de *S. cerevisiae* Y904 e *S. passalidarum* Y7204, os rendimentos de etanol foram de 0,32 (BT) e 0,33 g/g (ST), com produtividades de 0,83 e 0,71 g/L/h, e eficiências de 62 (BT) e 64% (ST), respectivamente. A maior concentração de etanol foi obtida utilizando o hidrolisado de BT, atingindo 20,00 g/L. Esses valores estão alinhados com estudos anteriores que relatam eficiências de conversão entre 55 e 95% em fermentações conduzidas com co-cultivos (Rodrigues *et al.*, 2024; Yadav *et al.*, 2011). Por exemplo, Rech *et al.* (2024) investigaram a produção de etanol por co-cultivo de *S. cerevisiae* (CAT-1) e *S. hagerdaliae* (UFMG-CMY-303) em hidrolisados de bagaço de cana pré-tratados por explosão a vapor. A hidrólise foi realizada com Celluclast a 15 FPU/g de biomassa, resultando em uma solução contendo 17 g/L de glicose e 3 g/L de xilose. Nessas condições, foram obtidos 11 g/L de etanol ($Y_{p/s} = 0,55$ g/g; $Q_p = 0,22$ g/L/h), correspondendo a uma eficiência fermentativa de 55%. No entanto, esses autores relatam que a presença de compostos inibitórios, como HMF (0,5 g/L), furfural (0,4 g/L) e, especialmente, ácido acético (1,8 g/L), próximo ao limiar de inibição, limitou o desempenho fermentativo. Esses dados reforçam a importância do controle de compostos tóxicos nos hidrolisados para garantir a viabilidade do processo fermentativo.

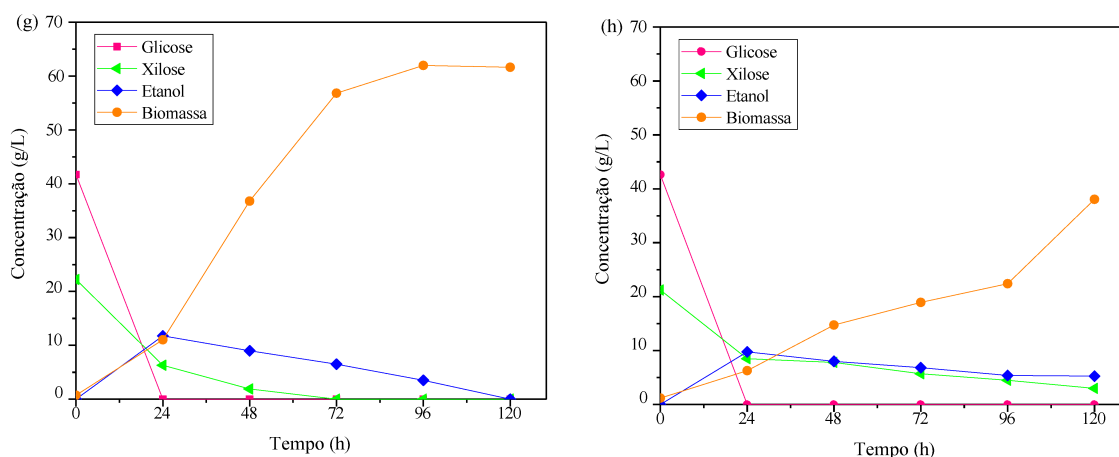
Nossos resultados da Fermentação 3 estão em conformidade com os obtidos por Wu *et al.* (2023). Estes autores pré-trataram palha de milho com solução binária de etilenodiamina (EDA) e água e realizaram hidrólise com Cellic Ctec2 (15 FPU/g de biomassa), obtendo hidrolisados contendo 40,2 g/L de glicose e 15,1 g/L de xilose. A fermentação do hidrolisado, conduzida com uma co-cultura de *S. cerevisiae* (M3013) e *Scheffersomyces stipitis* CBS6054, resultou em produção de 20,97 g/L de etanol, com rendimento de 0,39 g/g após 24 horas de fermentação. Esses autores observaram ainda a ocorrência de um fenômeno de repressão catabólica, dificultando a metabolização da xilose por *S. stipitis*. Inicialmente, houve uma competição entre as duas cepas pelo consumo de glicose nas primeiras 24 horas. Após o esgotamento da glicose, *S. stipitis* adaptou-se ao ambiente e começou a metabolizar a xilose

residual (Wu *et al.*, 2023). Esses resultados podem ser explicados pelas rotas metabólicas distintas das leveduras empregadas. *S. cerevisiae* exibe elevada taxa glicolítica e consome rapidamente a glicose; uma vez esgotada a hexose, as leveduras não convencionais redirecionam o fluxo de carbono pela via xilose-redutase/xilitol-desidrogenase (XR/XDH), o que acelera o consumo da xilose residual. Essa partição coordenada do substrato encurta o tempo total da fermentação e aumenta o rendimento de etanol (Sharma, Sharma e Kuila, 2018). Portanto, é provável que na Fermentação 3 tenha ocorrido o mesmo fenômeno de repressão catabólica sobre *S. passalidarum* Y7204.

Para mitigar os efeitos da repressão catabólica observada na fermentação simultânea, a Fermentação 4 foi conduzida de forma sequencial, com a adição da linhagem Y7204 após 24 horas, momento em que a glicose já havia sido completamente consumida por *S. cerevisiae*. Nessas condições, foram obtidas concentrações finais de etanol de 11,76 g/L para BT e 9,77 g/L para ST. Os rendimentos fermentativos foram de 0,27 g/g (BT) e 0,23 g/g (ST), com produtividades de 0,49 g/L/h (BT) e 0,41 g/L/h (ST), e eficiências de conversão de 52% (BT) e 50% (ST). Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Okuofu *et al.* (2023), na qual foi empregada a fermentação sequencial com inoculação inicial de *S. cerevisiae* BY4743, seguida pela adição de *S. stipitis* PsY633 após 24 horas. Neste estudo, subprodutos de feijão-caupi pré-tratados com H₂SO₄ e posteriormente hidrolisados enzimaticamente (Accellerase 1500 e Accellerase XY, 20/10 mg de proteína total) resultaram em um hidrolisado contendo 10,8 g/L de glicose e 4,6 g/L de xilose. A fermentação desse hidrolisado produziu 9,45 g/L de etanol, com rendimento de 0,38 g/g, produtividade de 0,17 g/L/h e eficiência global de conversão de 74%. Esses dados reforçam a eficácia da fermentação sequencial para mitigar a repressão catabólica, favorecendo o aproveitamento da xilose presente em hidrolisados lignocelulósicos. No entanto, neste estudo, apesar da adição de *S. passalidarum* de forma sequencial, não foram observados ganhos fermentativos expressivos após 24 horas de cultivo, possivelmente devido a um sinergismo negativo entre os microrganismos e à repressão causada pelas concentrações elevadas de etanol já presentes no momento da inoculação da segunda linhagem, resultantes da fermentação completa da glicose por *S. cerevisiae* (Nguyen, Praveen e Loh, 2019).

Figura 11: Fermentação alcoólica de hidrolisados pré-tratados de bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho (a) e (b) Fermentação 1 de BT e ST, utilizando *S. cerevisiae* Y904; (c) e (d) Fermentação 2 de BT e ST, por *S. passalidarum* Y7204., (e) e (f) Fermentação 3 de BT e ST, com co-cultivo de Y904 e Y7204, (g) e (h) Fermentação 4 de BT e ST, com co-cultivo de Y904 e Y7204, com adição de Y7204 após 24 horas.





Fonte: Autora.

Cabe ressaltar que os resultados indicaram uma tendência de crescimento celular após 48 horas de fermentação em todos os ensaios realizados (Figura 11), com destaque para o co-cultivo sequencial no hidrolisado de BT, que apresentou a maior concentração celular registrada (64,85 g/L). Observou-se uma correlação positiva entre o crescimento celular e a produção de etanol, indicando que a atividade fermentativa esteve associada à proliferação das leveduras até determinado ponto do processo. No entanto, o acúmulo de etanol a níveis elevados pode ter resultado em inibição metabólica, reduzindo significativamente a taxa fermentativa, mesmo na presença de açúcares no meio reacional (Matsushika e Sawayama, 2010; Keshav, Naseeruddin e Rao, 2016). Os resultados indicaram também que as leveduras apresentaram melhor crescimento celular no hidrolisado de BT. Isso pode estar relacionado à maior afinidade das leveduras por subprodutos de cana, visto que o resíduo apresenta maiores teores de minerais remanescentes após o processamento industrial de extração do caldo de cana (Mokomele, Brandt e Görgens, 2023).

Por sua vez, observou-se a diminuição da concentração de xilose no meio, juntamente com a redução da concentração de etanol. Esse comportamento sugere que a levedura não convencional, sob condições de estresse, pode ter apresentado flexibilidade metabólica e ter consumido o etanol como fonte alternativa de carbono para o seu crescimento. Nas fermentações 2, 3 e 4, o etanol atingiu seu pico em 24 horas de fermentação, momento em que a glicose já havia sido completamente consumida. Estes resultados indicam que a glicose foi mais fácil de assimilar devido às menores necessidades enzimáticas e de transporte, enquanto a xilose estava sendo consumida lentamente (Moysés *et al.*, 2016). Tais achados estão em conformidade com Antunes *et al.* (2022), que observaram que *S. parashehatae* UFMG-HM-60.1b consumiu toda a glicose nas primeiras horas de fermentação e, após a depleção da xilose,

o etanol remanescente no meio passou a ser consumido, provavelmente como substrato secundário, favorecendo a sobrevivência celular. Esses dados sugerem que, enquanto a glicose foi majoritariamente utilizada na via fermentativa para produção de etanol, a xilose atuou preferencialmente como fonte de carbono para manutenção celular (Li *et al.*, 2016).

Em resumo, os resultados demonstram o potencial dos hidrolisados enzimáticos de BT e ST para a produção de etanol 2G. *S. cerevisiae* apresentou alta eficiência na conversão de glicose, independentemente da biomassa utilizada, destacando sua reconhecida capacidade metabólica como espécie dominante na maioria dos processos fermentativos industriais (Frounnoon *et al.*, 2025; Wang *et al.*, 2025). Já *S. passalidarum* destacou-se pela co-fermentação de açúcares, alcançando a maior produção de etanol com o hidrolisado de ST (26,34 g/L). As fermentações em co-cultivo (Fermentações 3 e 4) mostraram-se promissoras, embora ainda demandem estudos para otimizar o processo e mitigar a repressão catabólica e o efeito inibitório do etanol. Esses achados confirmam a viabilidade do pré-tratamento com NH_4OH na sacarificação, bem como o papel promissor das leveduras na produção de etanol 2G a partir das biomassas investigadas.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o pré-tratamento com NH_4OH foi eficiente na remoção de lignina, com elevadas taxas de deslignificação (65,50 % em BT e 73,50 % em ST). A hidrólise enzimática em batelada alimentada resultou na liberação de 65,15 g/L de ART para BT e 70,18 g/L em ST, com baixa formação de compostos inibitórios, reforçando o papel positivo do pré-tratamento na sacarificação. Nos ensaios fermentativos, *S. cerevisiae* Y904 consumiu totalmente a glicose, obtendo rendimentos e produtividades máximos de 0,49 g/g e 0,87 g/L/h em ST. Na fermentação com *S. passalidarum* Y7204, a co-fermentação de glicose e xilose foi evidenciada, com destaque no hidrolisado de ST, produzindo 26,34 g/L de etanol ($Y_{p/s} = 0,44$ g/g; $Q_p = 0,73$ g/L/h; $\eta = 87\%$). Esses valores ressaltam o potencial dessa linhagem para produção de etanol 2G a partir de substratos lignocelulósicos. Por fim, nos ensaios das leveduras em co-cultivo, foram obtidas elevadas produtividades ($Q_p = 0,8$ g/L/h), porém, o fenômeno de repressão catabólica foi observado no co-cultivo sequencial, indicando a necessidade de otimizações adicionais. Esses achados confirmam a viabilidade do pré-tratamento com NH_4OH na sacarificação enzimática, especialmente em sabugo de milho, bem como o potencial das leveduras testadas na produção de etanol 2G a partir desses hidrolisados.

REFERÊNCIAS

- ABD, A. N. *et al.* Recent technologies in second-generation bioethanol production from biomass: A review. **International journal of green energy**, v. 22, n. 7, p. 1383–1401, 2025.
<https://doi.org/10.1080/15435075.2024.2432572>
- ABDELHAFEZ, S. E. *et al.* Experimental optimization with the emphasis on techno-economic analysis of production and purification of high value-added bioethanol from sustainable corn Stover. **Energies**, v. 15, n. 17, p. 6131, 2022.
<https://doi.org/10.3390/en15176131>
- ABOLORE, R. S.; JAISWAL, S.; JAISWAL, A. K. Green and sustainable pretreatment methods for cellulose extraction from lignocellulosic biomass and its applications: A review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 7, n. 100396, p. 100396, 2024
<https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100396>
- AGRAWAL, R. *et al.* Pretreatment process and its effect on enzymatic hydrolysis of biomass. *Em: Current Status and Future Scope of Microbial Cellulases*. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 145–169.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821882-2.00012-0>
- AITA, G. A.; SALVI, D. A.; WALKER, M. S. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of dilute ammonia pretreated energy cane. *Bioresource technology*, v. 102, n. 6, p. 4444–4448, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.095>
- ALBUINI, F. M. *et al.* Transcriptome profiling brings new insights into the ethanol stress responses of *Spathaspora passalidarum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 107, n. 21, p. 6573–6589, 2023.
<https://doi.org/10.1007/s00253-023-12730-x>
- ANTUNES, F. A. F. *et al.* Sustainable second-generation ethanol production from Switchgrass biomass via co-fermentation of pentoses and hexoses using novel wild yeasts. **Bioenergy research**, v. 15, n. 2, p. 1157–1168, 2022.
<https://doi.org/10.1007/s12155-021-10302-3>
- ANU *et al.* Multifarious pretreatment strategies for the lignocellulosic substrates for the generation of renewable and sustainable biofuels: A review. **Renewable energy**, v. 160, p. 1228–1252, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.031>
- ASCENCIO, J. J. *et al.* Comparative study of cellulosic sugars production from sugarcane bagasse after dilute nitric acid, dilute sodium hydroxide and sequential nitric acid-sodium hydroxide pretreatment. **Biomass conversion and biorefinery**, v. 10, n. 4, p. 813–822, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s13399-019-00547-6>
- ASHOKKUMAR, V. *et al.* Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts - A critical review. **Bioresource technology**, v. 344, n. 126195, p. 126195, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126195>

ATELGE, M. R. *et al.* A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. **Fuel (London, England)**, v. 270, n. 117494, p. 117494, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117494>

ATHIRA, G.; BAHURUDEEN, A.; APPARI, S. Thermochemical conversion of sugarcane bagasse: Composition, reaction kinetics, and characterisation of by-products. **Sugar tech: an international journal of sugar crops & related industries**, v. 23, n. 2, p. 433-452, 2021.
<https://doi.org/10.1007/s12355-020-00865-4>

AVCI, U. *et al.* Effects of Extractive Ammonia Pretreatment on the Ultrastructure and Glycan Composition of Corn Stover. **Frontiers in energy research**, v. 7, 2019.
<https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00085>

ÁVILA, P. F.; FORTE, M. B. S.; GOLDBECK, R. Evaluation of the chemical composition of a mixture of sugarcane bagasse and straw after different pretreatments and their effects on commercial enzyme combinations for the production of fermentable sugars. **Biomass & bioenergy**, v. 116, p. 180-188, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.06.015>

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>

BALAN, V.; MOHAMMADI, M.; DALE, B. E. Advancements in ammonia-based pretreatment: key benefits and industry applications. **RSC Sustainability**, 2025.
<https://doi.org/10.1039/D5SU00070J>

BANU J, R. *et al.* Lignocellulosic biomass pretreatment for enhanced bioenergy recovery: Effect of lignocelluloses recalcitrance and enhancement strategies. **Frontiers in energy research**, v. 9, 2021.
<https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.646057>

BARRETO, E. DA S. *et al.* Optimization of 2G ethanol production from sugarcane bagasse: Upscaling of soda pretreatment with redox mediator followed by fed-batch enzymatic hydrolysis and co-fermentation. **Energy conversion and management**, v. 323, n. 119225, p. 119225, 2025.
<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2024.119225>

BARUAH, J. *et al.* Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. **Frontiers in energy research**, v. 6, 2018.
<https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>

BASERA, P.; CHAKRABORTY, S.; SHARMA, N. Lignocellulosic biomass: insights into enzymatic hydrolysis, influential factors, and economic viability. **Discover sustainability**, v. 5, n. 1, 2024.
<https://doi.org/10.1007/s43621-024-00543-5>

BEKAS, D. G. *et al.* Self-healing materials: A review of advances in materials, evaluation, characterization and monitoring techniques. **Composites. Part B, Engineering**, v. 87, p. 92-119, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2015.09.057>

BENATTI, A. L. T.; POLIZELI, M. DE L. T. DE M. Lignocellulolytic biocatalysts: The main players involved in multiple biotechnological processes for biomass valorization.

Microorganisms, v. 11, n. 1, 2023.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11010162>

BERTELS, L.-K.; FERNÁNDEZ MURILLO, L.; HEINISCH, J. J. The pentose phosphate pathway in yeasts-more than a poor cousin of glycolysis. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, 2021.

<https://doi.org/10.3390/biom11050725>

BHATIA, S. K. *et al.* Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource technology**, v. 300, n. 122724, p. 122724, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>

BRODA, M.; YELLE, D. J.; SERWAŃSKA, K. Bioethanol production from lignocellulosic biomass-challenges and solutions. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 24, p. 8717, 2022.

<https://doi.org/10.3390/molecules27248717>

CADETE, R. M.; ROSA, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. **Yeast (Chichester, England)**, v. 35, n. 2, p. 191-199, 2017.

<https://doi.org/10.1002/yea.3279>

CAMPOS, V. J. *et al.* Physiological comparisons among *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae*, and *Scheffersomyces stipitis* reveal the bottlenecks for their use in the production of second-generation ethanol. **Brazilian journal of microbiology**, v. 53, n. 2, p. 977-990, 2022.

<https://doi.org/10.1007/s42770-022-00693-6>

CAO, S.; AITA, G. M. Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 131, p. 357-364, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.170>

CAO, Y. *et al.* Ammonia-mechanical pretreatment of wheat straw for the production of lactic acid and high-quality lignin. **Fermentation**, v. 9, n. 2, p. 177, 2023.

<https://doi.org/10.3390/fermentation9020177>

CARDONA, M. J. *et al.* A process for energy-efficient high-solids fed-batch enzymatic liquefaction of cellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 198, p. 488-496, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.042>

CARLSON, M. Regulation of glucose utilization in yeast. *Current opinion in genetics & development*, v. 8, n. 5, p. 560-564, 1998.

[https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(98\)80011-7](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(98)80011-7)

CARVALHO, D. J. *et al.* Assessment of the self-sustained energy generation of an integrated first and second generation ethanol production from sugarcane through the characterization of the hydrolysis process residues. **Energy conversion and management**, v. 203, n. 112267, p. 112267, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112267>

CAVELIUS, P. *et al.* The potential of biofuels from first to fourth generation. **PLoS biology**, v. 21, n. 3, p. e3002063, 2023.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002063>

CHANDEL, A. K. *et al.* Unraveling the structure of sugarcane bagasse after soaking in concentrated aqueous ammonia (SCAA) and ethanol production by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, p. 102, 2013.

<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-102>

CHANDUKISHORE *et al.* Re-routing the hemicellulosic fraction of lignocellulosic biomass toward value added products: A pragmatic bio refinery approach. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 12, n. 2, p. 111971, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.111971>

CHANU, N. B.; SINGH, A. B.; CHANDRAKUMAR SINGH, M. Microwave assisted catalysis for biofuel production. Em: **Bioenergy Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2023. p. 427-445.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98363-1.00016-8>

CHAURASIA, P. K. *et al.* Fungal pretreatment methods for organic wastes: advances and challenges in biomass valorization. **RSC Sustainability**, v. 3, n. 3, p. 1234-1266, 2025.

<https://doi.org/10.1039/D4SU00582A>

CHEN, Z. *et al.* Preparation and application of polyethyleneimine-modified corncob magnetic gel for removal of Pb(ii) and Cu(ii) ions from aqueous solution. **RSC advances**, v. 12, n. 4, p. 1950-1960, 2022.

<https://doi.org/10.1039/D1RA08699E>

CHUKWUMA, O. B. *et al.* Lignocellulolytic enzymes in biotechnological and industrial processes: A review. **Sustainability**, v. 12, n. 18, p. 7282, 2020.

<https://doi.org/10.3390/su12187282>

CHUNDAWAT, S. P. S. *et al.* Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. **Energy & environmental science**, v. 4, n. 3, p. 973, 2011.

<https://doi.org/10.1039/c0ee00574f>

DENG, W. *et al.* Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into chemicals and fuels. **Green energy & environment**, v. 8, n. 1, p. 10-114, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.gee.2022.07.003>

DEVI, A. *et al.* Ethanol from lignocellulosic biomass: An in-depth analysis of pre-treatment methods, fermentation approaches and detoxification processes. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 9, n. 5, p. 105798, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105798>

DEY, P. *et al.* Improved enzymatic hydrolysis of lignocellulosic waste biomass: most essential stage to develop cost-effective second-generation biofuel production. **Biofuels and Bioenergy**. Elsevier, 2022. p. 133-165.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90040-9.00030-8>

DU, R. *et al.* Enhanced enzymatic hydrolysis of corncob by ultrasound-assisted soaking in aqueous ammonia pretreatment. **3 biotech**, v. 8, n. 3, 2018.
<https://doi.org/10.1007/s13205-018-1186-2>

EBRAHIMIAN, F. *et al.* A critical review on pretreatment and detoxification techniques required for biofuel production from the organic fraction of municipal solid waste **Bioresource technology**, v. 368, n. 128316, p. 128316, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128316>

EJAZ, U.; SOHAIL, M.; GHANEMI, A. Cellulases: From bioactivity to a variety of industrial applications. **Biomimetics (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 3, 2021.
<https://doi.org/10.3390/biomimetics603004>

ETALE, A. *et al.* Cellulose: A review of water interactions, applications in composites, and water treatment. **Chemical reviews**, v. 123, n. 5, p. 2016-2048, 2023.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00477>

ETHAIB, S. Microwave-assisted pretreatment for lignocellulosic biomass energy conversion path. **Bioresource technology reports**, v. 28, n. 102006, p. 102006, 2024.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.102006>

FARIAS, D.; MAUGERI-FILHO, F. Sequential fed batch extractive fermentation for enhanced bioethanol production using recycled *Spathaspora passalidarum* and mixed sugar composition. **Fuel (London, England)**, v. 288, n. 119673, p. 119673, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119673>

FLÓREZ PARDO, L. M.; SALCEDO MENDOZA, J. G.; LÓPEZ GALÁN, J. E. Influence of pretreatments on crystallinity and enzymatic hydrolysis in sugar cane residues. **Brazilian journal of chemical engineering**, v. 36, n. 1, p. 131-141, 2019.
<https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190361s20180093>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of Food Security and Nutrition in the World 2019: safeguarding against economic slowdowns and downturns. Rome: FAO, 2019.

FORNAZIER, M. *et al.* Effects of alkaline pretreatment with sodium hydroxide with and without anthraquinone on the enzymatic hydrolysis of corncob and corn Stover and ethanol production. **Waste and biomass valorization**, 2024.
<https://doi.org/10.1007/s12649-024-02811-x>

FROUSNOON, T. B. *et al.* Comparison of stress tolerance mechanisms between *Saccharomyces cerevisiae* and the multistress-tolerant *Pichia kudriavzevii*. **FEMS yeast research**, v. 25, 2025.

<https://doi.org/10.1093/femsyr/foaf024>

FU, L.; TU, X.; YUAN, D. The time-varying dynamic impact of US renewable energy prices on agricultural prices in China: the case of fuel ethanol. **Environmental science and pollution research international**, v. 31, n. 24, p. 35412-35428, 2024.

<https://doi.org/10.1007/s11356-024-33480-x>

GALADIMA, A.; MASUDI, A.; MURAZA, O. Conversion of cellulose to glucose and further transformation into fuels over solid acid catalysts: A mini review. **Microporous and mesoporous materials: the official journal of the International Zeolite Association**, v. 336, n. 111846, p. 111846, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.02.148>

GANDAM, P. K.; CHINTA, M. L.; GANDHAM, A. P.; *et al.* A new insight into the composition and physical characteristics of corncob-substantiating its potential for tailored biorefinery objectives. **Fermentation**, v. 8, n. 12, p. 704, 2022.

<https://doi.org/10.3390/fermentation8120704>

GIRALDO, J. F. R.; MARIN, J. E. G. Application of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for protozoan analysis: A systematic review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 51, n. 104441, p. 104441, 2025.

<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2024.104441>

GOMES, B. F. M. L.; VAZ JÚNIOR, S.; GURGEL, L. V. A. Production of activated carbons from technical lignin as a promising pathway towards carbon emission neutrality for second-generation (2G) ethanol plants. **Journal of cleaner production**, n. 141648, p. 141648, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.141648>

GONÇALVES, D. B. *et al.* Ethanol production from macaúba (*Acrocomia aculeata*) presscake hemicellulosic hydrolysate by *Candida boidinii* UFMG14. **Bioresource technology**, v. 146, p. 261-266, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.075>

GONG, Z. *et al.* Fed-batch enzymatic hydrolysis of alkaline organosolv-pretreated corn stover facilitating high concentrations and yields of fermentable sugars for microbial lipid production. **Biotechnology for biofuels**, v. 13, n. 1, 2020.

<https://doi.org/10.1186/s13068-019-1639-9>

GOSWAMI, L. *et al.* A critical review on prospects of bio-refinery products from second and third generation biomasses. **Chemical engineering journal (Lausanne, Switzerland: 1996)**, v. 448, n. 137677, p. 137677, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137677>

GUNAM, I. B. W. *et al.* Enhanced delignification of corn straw with alkaline pretreatment at mild temperature. **Rasayan journal of chemistry**, v. 13, n. 02, p. 1022-1029, 2020.

<https://doi.org/10.31788/RJC.2020.1325573>

GUO, Y. *et al.* Production of cellulosic ethanol and value-added products from corn fiber. **Bioresources and bioprocessing**, v. 9, n. 1, 2022.

<https://doi.org/10.1186/s40643-022-00573-9>

GURGEL, L. V. A.; PIMENTA, M. T. B.; CURVELO, A. A. DA S. Enhancing liquid hot water (LHW) pretreatment of sugarcane bagasse by high pressure carbon dioxide (HP-CO₂). **Industrial crops and products**, v. 57, p. 141-149, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.034>

GUZMÁN, V. M. *et al.* Assessing process conditions on xylose fermentation in *Spathaspora passalidarum*: Effects of pH, substrate-to-inoculum ratio, temperature, and initial ethanol concentration. **Current microbiology**, v. 81, n. 12, p. 448, 2024.

<https://doi.org/10.1007/s00284-024-03976-3>

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

[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90002-7)

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

[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90002-7)

HALDAR, D. *et al.* A critical review on the effect of lignin redeposition on biomass in controlling the process of enzymatic hydrolysis. **Bioenergy research**, v. 15, n. 2, p. 863-874, 2022.

<https://doi.org/10.1007/s12155-021-10374-1>

HANS, M. *et al.* Liquid ammonia pretreatment optimization for improved release of fermentable sugars from sugarcane bagasse. **Journal of cleaner production**, v. 281, n. 123922, p. 123922, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123922>

HAQ, I. *et al.* Advances in valorization of lignocellulosic biomass towards energy generation. **Catalysts (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 3, p. 309, 2021.

<https://doi.org/10.3390/catal11030309>

HE, L. *et al.* Comparison of one-stage batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of pretreated hardwood for the production of biosugar. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 184, n. 4, p. 1441-1452, 2018.

<https://doi.org/10.1007/s12010-017-2633-y>

HERNANDEZ, C. C.; FERREIRA, F. F.; ROSA, D. S. X-ray powder diffraction and other analyses of cellulose nanocrystals obtained from corn straw by chemical treatments. **Carbohydrate polymers**, v. 193, p. 39-44, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.085>

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 205-214, 2012.

<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3694-4>

RANJAN, R. *et al.* Technological road map of Cellulase: A comprehensive outlook to structural, computational, and industrial applications. **Biochemical engineering journal**, v. 198, n. 109020, p. 109020, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109020>

HUANG, C. *et al.* Lignin-enzyme interaction: A roadblock for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 154, n. 111822, p. 111822, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111822>

IMMAN, S. *et al.* Fractionation and characterization of lignin from sugarcane bagasse using a sulfuric acid catalyzed solvothermal process. **RSC advances**, v. 11, n. 43, p. 26773-26784, 2021.

<https://doi.org/10.1039/D1RA03237B>

ISCI, A. *et al.* Aqueous ammonia soaking of switchgrass followed by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 69-77, 2008.

<https://doi.org/10.1007/s12010-007-8008-z>

JANG, S.-K.; JEONG, H.; CHOI, I.-G. The effect of cellulose crystalline structure modification on glucose production from chemical-composition-controlled biomass. **Sustainability**, v. 15, n. 7, p. 5869, 2023.

<https://doi.org/10.3390/su15075869>

JAVANMARD, A. *et al.* Breaking barriers for a green future: A comprehensive study on pre-treatment techniques for empty fruit bunches in the bio-based economy. **Process safety and environmental protection : transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part B**, v. 182, p. 535-558, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.11.053>

JIMÉNEZ, I. M. *et al.* Comparative data on effects of alkaline pretreatments and enzymatic hydrolysis on bioemulsifier production from sugarcane straw by *Cutaneotrichosporon mucoides*. **Bioresource technology**, v. 301, n. 122706, p. 122706, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122706>

JOHANNES, L. P.; XUAN, T. D. Comparative analysis of acidic and alkaline pretreatment techniques for bioethanol production from perennial grasses. **Energies**, v. 17, n. 5, p. 1048, 2024.

<https://doi.org/10.3390/en17051048>

JOY, S. P. *et al.* Variations in structure and saccharification efficiency of biomass of different sorghum varieties subjected to aqueous ammonia and glycerol pretreatments. **Industrial crops and products**, v. 159, n. 113072, p. 113072, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113072>

JÚNIOR CARVALHO MACHADO, P. *et al.* Characterization and properties of cementitious composites with cellulose fiber, silica fume and latex. **Construction and building materials**, v. 257, n. 119602, p. 119602, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.119602>

JUNIOR, C. S. *et al.* The effects of lignin removal and drying on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Cellulose (London, England)**, v. 20, n. 6, p. 3165-3177, 2013.

<https://doi.org/10.1007/s10570-013-0032-2>

KASAEIAN, A. *et al.* Review on bioethanol production from fruit peels. **Waste and biomass valorization**, 2025.

<https://doi.org/10.1007/s12649-025-02938-5>

KAVITHA, S. *et al.* Profitable biomethane production from delignified rice straw biomass: the effect of lignin, energy and economic analysis. **Green chemistry: an international journal and green chemistry resource: GC**, v. 22, n. 22, p. 8024-8035, 2020.

<https://doi.org/10.1039/D0GC02738C>

KAYIKCI, Ö.; NIELSEN, J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 6, 2015.

<https://doi.org/10.1093/femsyr/fov068>

KESHAV, P. K.; NASEERUDDIN, S.; RAO, L. V. Improved enzymatic saccharification of steam exploded cotton stalk using alkaline extraction and fermentation of cellulosic sugars into ethanol. **Bioresource technology**, v. 214, p. 363-370, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.108>

KHAIRE, K. C.; MOHOLKAR, V. S.; GOYAL, A. Bioconversion of sugarcane tops to bioethanol and other value added products: An overview. **Materials science for energy technologies**, v. 4, p. 54-68, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.12.004>

KIM, D. H. *et al.* Pretreatment and enzymatic saccharification of oak at high solids loadings to obtain high titers and high yields of sugars. **Bioresource technology**, v. 284, p. 391-397, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.134>

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 199, p. 42-48, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>

KIM, T. H. *et al.* Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. **Bioresource technology**, v. 90, n. 1, p. 39-47, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00097-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00097-X)

KO, J. K. *et al.* Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes.

Bioresource technology, v. 100, n. 19, p. 4374-4380, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.026>

KOLO, S. M. D. *et al.* The Effect of Fermentation Time, pH and *Saccharomyces cerevisiae* Concentration for Bioethanol Production from *Ulva Reticulata* Macroalgae. **Trends in Sciences**, v. 21, n. 5, p. 7484, 2024.

<https://doi.org/10.48048/tis.2024.7484>

KORDALA, N. *et al.* 2G-biofuel ethanol: an overview of crucial operations, advances and limitations. **Biomass conversion and biorefinery**, v. 14, n. 3, p. 2983-3006, 2024.

<https://doi.org/10.1007/s13399-022-02861-y>

KUMAR, A. *et al.* Optimizing Cellulases Production by *Trichoderma atroviride* AD-130 under Submerged Fermentation using Low-Cost Substrates. *Journal of biochemical technology*, v. 14, n. 2, p. 125-133, 2023.

<https://doi.org/10.51847/hmyfBAsNQG>

KUMAR, A.; CHANDRA, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03170, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>

KUMAR, N. *et al.* Ultrasound-assisted alkaline pretreatment of *Parthenium hysterophorus* for fermentable sugar production using a response surface approach. **Sustainable Chemistry for Climate Action**, v. 2, n. 100027, p. 100027, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.scca.2023.100027>

KUMAR, R. *et al.* Development of a two-step hydrothermal pretreatment for sugarcane bagasse delignification surpassing acidic and chemical methods. **Waste and biomass valorization**, v. 15, n. 8, p. 4613-4628, 2024.

<https://doi.org/10.1007/s12649-024-02471-x>

KUMAR, R. *et al.* Lignocellulose biomass pyrolysis for bio-oil production: A review of biomass pre-treatment methods for production of drop-in fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 123, n. 109763, p. 109763, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109763>

KUMAR, V. *et al.* Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. **Bioresource technology**, v. 323, n. 124566, p. 124566, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>

KUSMIYATI, K. *et al.* Effect of dilute acid and alkaline pretreatments on enzymatic saccharification of palm tree trunk waste for bioethanol production. **BULLETIN OF CHEMICAL REACTION ENGINEERING AND CATALYSIS**, v. 14, n. 3, p. 705-714, 2019.

<https://doi.org/10.9767/bcrec.14.3.4256.705-714>

LACKNER, M.; BESHARATI, M. Agricultural waste: Challenges and solutions, a review. **Waste**, v. 3, n. 2, p. 18, 2025.

<https://doi.org/10.3390/waste3020018>

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

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

LAOPAIBOON, L. *et al.* Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: effects of carbon and nitrogen supplementations. **Bioresource technology**, v. 100, n. 18, p. 4176-4182, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.046>

LATIF, A. A. *et al.* Ammonia-based pretreatment for ligno-cellulosic biomass conversion - an overview. **Journal of engineering science and technology**, v. 13, p. 1595-1620, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122446>

LEE, E.-J. *et al.* Sequential pretreatment of lignocellulosic biomass employing hydrothermal treatment and ball milling to improve the efficiency of enzymatic hydrolysis. **Industrial crops and products**, v. 222, n. 120119, p. 120119, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120119>

LI, H. *et al.* Modeling and design of fed-batch strategies for achieving 255 g/L sugar concentration from high-solid enzymatic hydrolysis of pretreated corn stover. **Chemical engineering journal (Lausanne, Switzerland: 1996)**, v. 486, n. 150268, p. 150268, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.150268>

LI, T.; TAKKELLAPATI, S. The current and emerging sources of technical lignins and their applications. **Biofuels, bioproducts & biorefining : Biofpr**, v. 12, n. 5, p. 756-787, 2018.

<https://doi.org/10.1002/bbb.1913>

LI, X. *et al.* Quantitative visualization of lignocellulose components in transverse sections of moso bamboo based on FTIR macro- and micro-spectroscopy coupled with chemometrics. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, 2018.

<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1251-4>

LIN, C.-Y.; LU, C. Development perspectives of promising lignocellulose feedstocks for production of advanced generation biofuels: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 136, n. 110445, p. 110445, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110445>

LIU, B. *et al.* Study on saccharification and alcohol fermentation of alkaline pretreated corn cobAIP Conference Proceedings. **Anais.AIP Publishing**, 2019.

<https://doi.org/10.1063/1.5110818>

LIU, B. *et al.* Study on saccharification and alcohol fermentation of alkaline pretreated corn cobINTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE FRONTIERS OF BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING (FBB 2019), 2019b.

<https://doi.org/10.1063/1.5110818>

LIU, Z. *et al.* Valorization of food waste to produce value-added products based on its bioactive compounds. **Processes (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 3, p. 840, 2023.

<https://doi.org/10.3390/pr11030840>

LONG, T. M. *et al.* Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5492-5500, 2012.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00374-12>

LORENCI WOICIECHOWSKI, A. *et al.* Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance - Conventional processing and recent advances. **Bioresource technology**, v. 304, n. 122848, p. 122848, 2020a.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122848>

ŁUKAJTIS, R.; RYBARCZYK, P.; *et al.* Optimization of saccharification conditions of lignocellulosic biomass under alkaline pre-treatment and enzymatic hydrolysis. **Energies**, v. 11, n. 4, p. 886, 2018.

<https://doi.org/10.3390/en11040886>

LYU, Q. *et al.* Effects of lignocellulosic biomass-derived hydrolysate inhibitors on cell growth and lipid production during microbial fermentation of oleaginous microorganisms-A review. **Fermentation**, v. 11, n. 3, p. 121, 2025.

<https://doi.org/10.3390/fermentation11030121>

MACHADO, P J. C. *et al.* Characterization and properties of cementitious composites with cellulose fiber, silica fume and latex. **Construction and building materials**, v. 257, n. 119602, p. 119602, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.119602>

MAICAS, S. The role of yeasts in fermentation processes. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, 2020.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

MALAKAR, S.; PAUL, S. K.; JOLVIS POU, K. R. Biotechnological interventions in beverage production. *Em: Biotechnological Progress and Beverage Consumption*. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 1–37.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816678-9.00001-1>

MALIK, K. *et al.* Enhanced ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* fermentation post acidic and alkali chemical pretreatments of cotton stalk lignocellulose. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 147, n. 104869, p. 104869, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104869>

MANKAR, A. R. *et al.* Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. **Bioresource technology**, v. 334, n. 125235, p. 125235, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125235>

MARIANA, M. *et al.* A current advancement on the role of lignin as sustainable reinforcement material in biopolymeric blends. **Journal of materials research and technology**, v. 15, p. 2287-2316, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.08.139>

MARTINEZ-JIMENEZ, F. D. et al. Exploiting the non-conventional yeast *Spathaspora passalidarum* as a platform for hemicellulosic hydrolysate conversion into bioproducts: A mini review. **Bioenergy research**, v. 14, n. 2, p. 689-708, 2021.
<https://doi.org/10.1007/s12155-021-10257-5>

MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S. Effect of initial cell concentration on ethanol production by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* with xylose-fermenting ability. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 1952-1960, 2010.
<https://doi.org/10.1007/s12010-010-8972-6>

MD SALLEH, M. *et al.* Potential applications of lignin and its derivatives from lignocellulosic biomass - a review. **Jurnal teknologi**, v. 85, n. 3, p. 43-59, 2023.
<https://doi.org/10.11113/jurnalteknologi.v85.15032>

MEKALA, N. K. *et al.* Current bioenergy researches. Em: Bioenergy Research: **Advances and Applications**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 1-21.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00001-2>

MERRETTIG-BRUNS, U.; SAYDER, B. Pretreatment with ammonia. Em: **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 461-481.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00020-7>

MESA, L. *et al.* Ethanol production from sugarcane straw using different configurations of fermentation and techno-economical evaluation of the best schemes. **Renewable energy**, v. 156, p. 377-388, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.091>

MES-HARTREE, M.; DALE, B. E.; CRAIG, W. K. Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 462-468, 1988.
<https://doi.org/10.1007/BF00269069>

Miller GA. George A. Miller. In: Gardner Lindzey., editor. A history of psychology in autobiography. VIII. Stanford, CA: Stanford University Press; 1959. pp. 391-418.

MORÉ, M. I. et al. A dose-escalation study demonstrates the safety and tolerability of cellobiose in healthy subjects. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 64, 2019.
<https://doi.org/10.3390/nu12010064>

MOHAMMADI, M. *et al.* Multifaced application of AFEX-pretreated biomass in producing second-generation biofuels, ruminant animal feed, and value-added bioproducts. **Biotechnology advances**, v. 72, n. 108341, p. 108341, 2024.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108341>

MOHD AZHAR, S. H. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 10, p. 52-61, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>

MOKOMELE, T.; BRANDT, B. A.; GÖRGENS, J. F. Effective fermentation of sugarcane bagasse whole slurries using robust xylose-capable *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioenergy research**, v. 16, n. 4, p. 2297-2313, 2023.
<https://doi.org/10.1007/s12155-023-10577-8>

MOYA, E. B. *et al.* Tailoring a cellulolytic enzyme cocktail for efficient hydrolysis of mildly pretreated lignocellulosic biomass. **Enzyme and microbial technology**, v. 175, n. 110403, p. 110403, 2024.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2024.110403>

MOYSÉS, D. N. *et al.* Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 207, 2016.
<https://doi.org/10.3390/ijms17030207>

MUJTABA, M. *et al.* Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. **Journal of cleaner production**, v. 402, n. 136815, p. 136815, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136815>

MÜLLER, C. *et al.* Challenges and opportunities for third-generation ethanol production: A critical review. **Engineering Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 100056, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.engmic.2022.100056>

NADEEM, M. *et al.* Production of ethanol from alkali-pretreated sugarcane bagasse under the influence of different process parameters. **Frontiers in life science**, v. 8, n. 4, p. 358-362, 2015.
<https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1044620>

NAKANISHI, S. C. *et al.* Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2211-2221, 2017.
<https://doi.org/10.1002/bit.26357>

NAM, S. *et al.* Segal crystallinity index revisited by the simulation of X-ray diffraction patterns of cotton cellulose I β and cellulose II. **Carbohydrate polymers**, v. 135, p. 1-9, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.035>

NARESH KUMAR, M. *et al.* Choice of pretreatment technology for sustainable production of bioethanol from lignocellulosic biomass: Bottle necks and recommendations. **Waste and biomass valorization**, v. 10, n. 6, p. 1693-1709, 2019.
<https://doi.org/10.1007/s12649-017-0177-6>

NARGOTRA, P. *et al.* Application of ionic liquid and alkali pretreatment for enhancing saccharification of sunflower stalk biomass for potential biofuel-ethanol production. **Bioresource technology**, v. 267, p. 560-568, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.070>

NAVEED, M. H. *et al.* Cellulosic biomass fermentation for biofuel production: Review of artificial intelligence approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 189, n. 113906, p. 113906, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113906>

NDUBUISI, I. A. *et al.* Non-conventional yeast strains: Unexploited resources for effective commercialization of second generation bioethanol. **Biotechnology advances**, v. 63, p. 108100, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108100>

NGUYEN, D. T. T.; PRAVEEN, P.; LOH, K.-C. Co-culture of *Zymomonas mobilis* and *Scheffersomyces stipitis* immobilized in polymeric membranes for fermentation of glucose and xylose to ethanol. **Biochemical engineering journal**, v. 145, p. 145-152, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.02.019>

NUNTA, R. *et al.* Valorization of rice straw, sugarcane bagasse and sweet sorghum bagasse for the production of bioethanol and phenylacetylcarbinol. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 727, 2023.

<https://doi.org/10.1038/s41598-023-27451-4>

OCHOA-CHACÓN, A. *et al.* Xylose metabolism in bioethanol production: *Saccharomyces cerevisiae* vs non-*Saccharomyces* yeasts. **Bioenergy research**, v. 15, n. 2, p. 905-923, 2022.

<https://doi.org/10.1007/s12155-021-10340-x>

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>

OKUOFU, S. I. *et al.* Simultaneous saccharification and bioethanol production from underutilized biomass, cowpea haulm using co-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* (BY4743) and *Scheffersomyces stipitis* (PsY633). **Biomass conversion and biorefinery**, v. 13, n. 9, p. 7505-7519, 2023.

<https://doi.org/10.1007/s13399-021-01368-2>

OLADI, S.; AITA, G. M. Optimization of liquid ammonia pretreatment variables for maximum enzymatic hydrolysis yield of energy cane bagasse. **Industrial crops and products**, v. 103, p. 122-132, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.02.023>

OLIVEIRA, D. M. *et al.* Feruloyl esterases: Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production of bioactive compounds. **Bioresource technology**, v. 278, p. 408-423, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.064>

OLIVEIRA, P. DE *et al.* Combination of high solid load, on-site enzyme cocktails and surfactant in the hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse and ethanol production. **Waste and biomass valorization**, v. 13, n. 6, p. 3085-3094, 2022.

<https://doi.org/10.1007/s12649-022-01685-1>

PALLADINO, F. *et al.* Novel potential yeast strains for the biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. **Biofuels, bioproducts & biorefining : Biofpr**, v. 15, n. 3, p. 690-702, 2021.

<https://doi.org/10.1002/bbb.2196>

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)

PANAKKAL, E. J. *et al.* Impact of sulfuric acid pretreatment of durian peel on the production of fermentable sugar and ethanol. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 98, n. 12, p. 100264, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100264>

PANG, L. *et al.* How does natural resource depletion affect energy security risk? New insights from major energy-consuming countries. **Energy strategy reviews**, v. 54, n. 101460, p. 101460, 2024.
<https://doi.org/10.1016/j.esr.2024.101460>

PARK, Y. C. *et al.* Two-stage flow-through pretreatment of Helianthus tuberosus residue for enzymatic production of fermentable sugar by alkaline and acidic solutions. **Bioresources**, v. 12, n. 3, 2017.
<https://doi.org/10.15376/biores.12.3.6504-6517>

PASQUINI, D. *et al.* Sugar cane bagasse pulping using supercritical CO₂ associated with co-solvent 1-butanol/water. **The journal of supercritical fluids**, v. 34, n. 2, p. 125-131, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2004.11.005>

PATEL, A.; SHAH, A. R. Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, v. 6, n. 2, p. 108-128, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.02.001>

PIZARRO, I. F. *et al.* Food Defense in the extra neutral alcohol industry: Ensuring safety against intentional contaminations. **Processes (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 4, p. 1243, 2025.
<https://doi.org/10.3390/pr13041243>

PONCE, J. *et al.* Alkali pretreated sugarcane bagasse, rice husk and corn husk wastes as lignocellulosic biosorbents for dyes. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, n. 100061, p. 100061, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100061>

QIN, L. *et al.* High temperature aqueous ammonia pretreatment and post-washing enhance the high solids enzymatic hydrolysis of corn stover. **Bioresource technology**, v. 146, p. 504-511, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.099>

RAJESH BANU, J. *et al.* Lignocellulosic biomass based biorefinery: A successful platform towards circular bioeconomy. **Fuel (London, England)**, v. 302, n. 121086, p. 121086, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121086>

RAMOS, L. *et al.* High-solid enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and ethanol production in repeated batch process using column reactors. **3 biotech**, v. 11, n. 10, p. 432, 2021.

<https://doi.org/10.1007/s13205-021-02932-3>

RAO, M. M. *et al.* A comprehensive review on agricultural waste production and onsite management with circular economy opportunities. **Discover sustainability**, v. 5, n. 1, 2024.

<https://doi.org/10.1007/s43621-024-00492-z>

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Assessment of indigenous fungal biocatalysts towards valorization of delignified physico-chemically pretreated corn cobs and sugarcane bagasse. **Biofuels, bioproducts & biorefining : Biofpr**, v. 17, n. 1, p. 153-166, 2023.

<https://doi.org/10.1002/bbb.2435>

RECH, F. R. *et al.* Ethanol production via co-fermentation of C6 and C5 sugars from steam-pretreated sugarcane bagasse hydrolysates using non-GM yeasts *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CMY-303. **Biomass conversion and biorefinery**, v. 14, n. 5, p. 6359-6368, 2024.

<https://doi.org/10.1007/s13399-022-02751-3>

RIBEIRO, L. E. *et al.* Influence of glucose on xylose metabolism by *Spathaspora passalidarum*. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 157, n. 103624, p. 103624, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103624>

RITIKA *et al.* Simultaneous fermentation of glucose and xylose by using co-culture of *S. cerevisiae* and a potential robust pentose fermenting fungi (*Fusarium incarnatum*). **Biomass conversion and biorefinery**, v. 13, n. 9, p. 8089-8100, 2023.

<https://doi.org/10.1007/s13399-021-01801-6>

RODRIGUES, P. H. F. *et al.* Bioethanol production by immobilized co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* in a novel continuous 3D printing microbioreactor. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 96, n. suppl 1, p. e20230633, 2024.

<https://doi.org/10.1590/0001-3765202420230633>

ROHMAN, A.; DIJKSTRA, B. W.; PUSPANINGSIH, N. N. T. B-xylosidases: Structural diversity, catalytic mechanism, and inhibition by monosaccharides. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 22, 2019.

<https://doi.org/10.3390/ijms20225524>

ROY, R.; RAHMAN, M. S.; RAYNIE, D. E. Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 3, n. 100035, p. 100035, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100035>

RUCHALA, J. *et al.* Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 109-132, 2019.

<https://doi.org/10.1007/s10295-019-02242-x>

SALEM, K. S. *et al.* Comparison and assessment of methods for cellulose crystallinity determination. **Chemical Society reviews**, v. 52, n. 18, p. 6417-6446, 2023.
<https://doi.org/10.1039/D2CS00569G>

SAMOMSSA, I. *et al.* The effect of corn cob, cotton shell and rice straw mixture during carbonization on charcoal yield using mixture design. **Journal of the Indian Chemical Society**, n. 101498, p. 101498, 2024.
<https://doi.org/10.1016/j.jics.2024.101498>

SANTOS, D. DE *et al.* Brazil and the world market in the development of technologies for the production of second-generation ethanol. **Alexandria Engineering Journal**, v. 67, p. 153-170, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.aej.2022.09.004>

SAWARKAR, A. N. *et al.* Bioethanol from various types of banana waste: A review. **Bioresource technology reports**, v. 18, n. 101092, p. 101092, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101092>

SEGAL, L. *et al.* An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile research journal**, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.
<https://doi.org/10.1177/004051755902901003>

SHARMA, L. *et al.* Optimization of alkali pretreatment and enzymatic saccharification of jute (*Corchorus olitorius* L.) biomass using response surface methodology. **Bioresource technology**, v. 368, n. 128318, p. 128318, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128318>

SHARMA, P. *et al.* Sustainable processing of food waste for production of bio-based products for circular bioeconomy. **Bioresource technology**, v. 325, n. 124684, p. 124684, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124684>

SHARMA, S. *et al.* Environment friendly pretreatment approaches for the bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value-added products. **Environments**, v. 10, n. 1, p. 6, 2022.
<https://doi.org/10.3390/environments10010006>

SHARMA, S.; SHARMA, V.; KUILA, A. Simultaneous saccharification and fermentation of corn husk by co-culture strategy. **Journal of petroleum & environmental biotechnology**, v. 09, n. 01, 2018.
<https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000360>

SHI, T. *et al.* Pre-treatment of sugarcane bagasse with aqueous ammonia-glycerol mixtures to enhance enzymatic saccharification and recovery of ammonia. **Bioresource technology**, v. 289, n. 121628, p. 121628, 2019a.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121628>

SHRESTHA, S. *et al.* Different facets of lignocellulosic biomass including pectin and its perspectives. *Waste and biomass valorization*, v. 12, n. 9, p. 4805-4823, 2021.
<https://doi.org/10.1007/s12649-020-01305-w>

SHUKLA, A. *et al.* Strategies of pretreatment of feedstocks for optimized bioethanol production: distinct and integrated approaches. *Biotechnology for biofuels and bioproducts*, v. 16, n. 1, 2023.
<https://doi.org/10.1186/s13068-023-02295-2>

SILVA SOUZA, E. F. F. DA *et al.* Avaliação da capacidade adsorptiva do sabugo de milho triturado / Assessment of the adsorptive capacity of shrimped corncob. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 4, p. 1174-1190, 2019.

SILVA, T. A. L. *et al.* Effect of steam explosion pretreatment catalysed by organic acid and alkali on chemical and structural properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Waste and biomass valorization**, v. 9, n. 11, p. 2191-2201, 2018.
<https://doi.org/10.1007/s12649-017-9989-7>

SILVELLO, M. A. DE C.; GASPAROTTO, G. A.; GOLDBECK, R. Enzymatic hydrolysis of carbohydrate-rich *Chlorella vulgaris* for third-generation bioethanol production by cellulase-recombinant yeast. **Cleaner Chemical Engineering**, v. 6, n. 100111, p. 100111, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.clce.2023.100111>

SINGH, B. *et al.* Editorial: Emerging Feedstocks & Clean Technologies for Lignocellulosic Biofuel. **Frontiers in energy research**, v. 10, 2022.
<https://doi.org/10.3389/fenrg.2022.917081>

SINGH, D.; GUPTA, N. Microbial Laccase: a robust enzyme and its industrial applications. *Biologia*, v. 75, n. 8, p. 1183-1193, 2020.
<https://doi.org/10.2478/s11756-019-00414-9>

SIPPONEN, M. H.; ÖSTERBERG, M. Aqueous ammonia pre-treatment of wheat straw: Process optimization and broad spectrum dye adsorption on nitrogen-containing lignin. *Frontiers in chemistry*, v. 7, p. 545, 2019.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00545>

SOLARTE-TORO, J. C. *et al.* Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 107, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.024>

SOUZA, Gisele de Fátima Leite. IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE LARVAS, INTESTINO DE BESOUROS, GALERIAS E MADEIRA EM DECOMPOSIÇÃO EM ÁREAS DE FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA. 2022. 83 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia, Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.

SPEIGHT, J. G. Production of fuels from nonfossil fuel feedstocks. Em: The Refinery of the Future. Elsevier, 2020. p. 391-426.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816994-0.00011-7>

SU, Y.-K.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 457-469, 2015.

<https://doi.org/10.1002/bit.25445>

SUGIHARTO, Y. E. C. *et al.* Enzyme feeding strategies for better fed-batch enzymatic hydrolysis of empty fruit bunch. **Bioresource technology**, v. 207, p. 175-179, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.113>

ŚWIĄTEK, K. *et al.* Acid hydrolysis of lignocellulosic biomass: Sugars and furfurals formation. **Catalysts (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 4, p. 437, 2020.

<https://doi.org/10.3390/catal10040437>

TAREEN, A. K. *et al.* Cellulase addition and pre-hydrolysis effect of high solid fed-batch simultaneous saccharification and ethanol fermentation from a combined pretreated oil palm trunk. **ACS omega**, v. 6, n. 40, p. 26119-26129, 2021.

<https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03111>

THITE, V. S.; NERURKAR, A. S. Valorization of sugarcane bagasse by chemical pretreatment and enzyme mediated deconstruction. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52347-7>

TONG, J. *et al.* Deep eutectic solvent pretreatment for green preparation of nanocellulose. **Cellulose (London, England)**, v. 30, n. 8, p. 4773-4792, 2023.

<https://doi.org/10.1007/s10570-023-05154-3>

TOOR, M. *et al.* An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Chemosphere**, v. 242, n. 125080, p. 125080, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125080>

TOPALOĞLU, A. *et al.* From *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol: Unlocking the power of evolutionary engineering in metabolic engineering applications. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 10, 2023.

<https://doi.org/10.3390/jof9100984>

TSAL, M.-H. *et al.* Evaluation of different pretreatments of Napier grass for enzymatic saccharification and ethanol production. **Energy science & engineering**, v. 6, n. 6, p. 683-692, 2018.

<https://doi.org/10.1002/ese3.243>

UKRAINE; IANIEVA, O. D. Pentose-fermenting yeasts in nature: Ecology, biodiversity and applications. **Mikrobiolohichniy zhurnal (Kiev, Ukraine: 1993)**, v. 84, n. 5, p. 58-71, 2023.

<https://doi.org/10.15407/microbiolj84.05.058>

UNGUREANU, N.; VLĂDUȚ, V.; BIRIȘ, S.-ȘTEFAN. Sustainable valorization of waste and by-products from sugarcane processing. **Sustainability**, v. 14, n. 17, p. 11089, 2022.
<https://doi.org/10.3390/su141711089>

VELMURUGAN, R. *et al.* Ionic liquid under alkaline aqueous conditions improves corncob delignification, polysaccharide recovery, enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Biomass & bioenergy**, v. 178, n. 106980, p. 106980, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106980>

WANG, J. *et al.* Enhanced saccharification of sugarcane bagasse by the optimization of low concentration of NaOH and ammonia pretreatment. **Industrial crops and products**, v. 172, n. 114016, p. 114016, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114016>

WANG, L. *et al.* Extraction strategies for lignin, cellulose, and hemicellulose to obtain valuable products from biomass. **Advanced composites and hybrid materials**, v. 7, n. 6, 2024.
<https://doi.org/10.1007/s42114-024-01009-y>

WANG, Q. *et al.* Low-temperature sodium hydroxide pretreatment for ethanol production from sugarcane bagasse without washing process. **Bioresource technology**, v. 291, n. 121844, p. 121844, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121844>

WANG, T.; LÜ, X. Overcome saccharification barrier. Em: **Advances in 2nd Generation of Bioethanol Production**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 137-159.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818862-0.00005-4>

WANG, Z. *et al.* Synthetic evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for biomanufacturing: Approaches and applications. **Life**, v. 4, n. 1, p. 1-16, 2025.
<https://doi.org/10.1002/mlf2.12167>

WIVES, A. P. *et al.* A review of genetic engineering techniques for CTG(Ser1) and CTG(Ala) D-xylose-metabolizing yeasts employed for second-generation bioethanol production. **Process biochemistry (Barking, London, England)**, v. 146, p. 539-546, 2024.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.09.028>

WOŹNIAK, A. *et al.* Review of lignocellulosic biomass pretreatment using physical, thermal and chemical methods for higher yields in bioethanol production. **Sustainability**, v. 17, n. 1, p. 287, 2025.
<https://doi.org/10.3390/su17010287>

WU, D. *et al.* Lignocellulose biomass bioconversion during composting: Mechanism of action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives. **Chemosphere**, v. 286, n. Pt 1, p. 131635, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131635>

WU, W. *et al.* The role of lignin structure on cellulase adsorption and enzymatic hydrolysis. **Biomass (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 1, p. 96-107, 2023.

<https://doi.org/10.3390/biomass3010007>

WU, Y. *et al.* Understanding the Dynamics of the *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* Abundance in Co-culturing Process for Bioethanol Production from Corn Stover. **Waste and biomass valorization**, v. 14, n. 1, p. 43-55, 2023.

<https://doi.org/10.1007/s12649-022-01861-3>

WU, Z. *et al.* Lignocellulose dissociation with biological pretreatment towards the biochemical platform: A review. **Materials today. Bio**, v. 16, n. 100445, p. 100445, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100445>

XU, H.; LI, B.; MU, X. Review of alkali-based pretreatment to enhance enzymatic saccharification for lignocellulosic biomass conversion. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 55, n. 32, p. 8691-8705, 2016.

<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b01907>

YADAV, K. S. *et al.* Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 11, p. 6473-6478, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.019>

YANG, X. *et al.* Production of hemicellulose sugars combined with the alkaline extraction lignin increased the hydro-depolymerization of cellulose from corn cob. **Sustainability**, v. 15, n. 11, p. 9041, 2023.

<https://doi.org/10.3390/su15119041>

YONG CHEOLPARK, JEONG-JUN YOON, SANG-HYOUN KIM, TAE HYUN KIM, AND JUN SEOK KIM. Two-Stage Flow-Through Pretreatment of *Helianthus tuberosus* Residue for Enzymatic Production of Fermentable Sugar by Alkaline and Acidic Solutions. **BioResources**, p. 6504-6517, 2017.

<https://doi.org/10.15376/biores.12.3.6504-6517>

YU, Q. *et al.* Pretreatment of sugarcane bagasse with liquid hot water and aqueous ammonia. **Bioresource technology**, v. 144, p. 210–215, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.078>

YUAN, X. *et al.* Extraction of corn bract cellulose by the ammonia-coordinated bio-enzymatic method. **Polymers**, v. 15, n. 1, p. 206, 2024.

<https://doi.org/10.3390/polym15010206>

ZENG, L. *et al.* Metabolome analysis of the response and tolerance mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* to formic acid stress. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 148, n. 106236, p. 106236, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106236>

ZENTOU, H. *et al.* A new model of alcoholic fermentation under a byproduct inhibitory effect. **ACS omega**, v. 6, n. 6, p. 4137–4146, 2021.

<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04025>

ZHAI, R.; HU, J.; JIN, M. Towards efficient enzymatic saccharification of pretreated lignocellulose: Enzyme inhibition by lignin-derived phenolics and recent trends in mitigation strategies. **Biotechnology advances**, v. 61, n. 108044, p. 108044, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108044>

ZHANG, H.; WU, J. Statistical optimization of aqueous ammonia pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn cob powder for enhancing sugars production. **Biochemical engineering journal**, v. 174, n. 108106, p. 108106, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108106>

ZHANG, HONGDAN *et al.* Enhancement of enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by the combination of delignification pretreatment and Polysorbate 80. **Fermentation**, v. 9, n. 4, p. 371, 2023.

<https://doi.org/10.3390/fermentation9040371>

ZHANG, Z. *et al.* Effective gossypol removal from cottonseed meal through optimized solid-state fermentation by *Bacillus coagulans*. **Microbial cell factories**, v. 21, n. 1, p. 252, 2022.

<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01976-1>

ZHAO, L.; SUN, Z.-F.; *et al.* Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy production: Challenges and perspectives. **Bioresource technology**, v. 343, n. 126123, p. 126123, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126123>

ZHAO, L.; ZHANG, J.; *et al.* Biological degradation of lignin: A critical review on progress and perspectives. **Industrial crops and products**, v. 188, n. 115715, p. 115715, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115715>

ZHOU, M.; TIAN, X. Development of different pretreatments and related technologies for efficient biomass conversion of lignocellulose. **International journal of biological macromolecules**, v. 202, p. 256–268, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.036>

ZHU, J.-Q. *et al.* Stepwise pretreatment of aqueous ammonia and ethylenediamine improve enzymatic hydrolysis of corn stover. **Industrial crops and products**, v. 124, p. 201–208, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.072>

ZHU, Z. *et al.* Comparative evaluation of microwave-assisted acid, alkaline, and inorganic salt pretreatments of sugarcane bagasse for sugar recovery. **Biomass conversion and biorefinery**, v. 11, n. 6, p. 2681–2693, 2021.

<https://doi.org/10.1007/s13399-020-00680-7>

ZOGLAMI, A.; PAËS, G. Lignocellulosic biomass: Understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. **Frontiers in chemistry**, v. 7, 2019.

<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>