UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE

CAMPUS CASCAVEL

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU EM ENGENHARIA AGRÍCOLA:

**RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL** 

# PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ETANOL A PARTIR DAS FRAÇÕES CELULÓSICA E HEMICELULÓSICA DO BAGAÇO DE SORGO SACARINO

DANIELLE CAMARGO

CASCAVEL

FEVEREIRO – 2016

### DANIELLE CAMARGO

## PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ETANOL A PARTIR DAS FRAÇÕES CELULÓSICA E HEMICELULÓSICA DO BAGAÇO DE SORGO SACARINO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* de Engenharia Agrícola, em requisito para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, na área de concentração Recursos Hidricos e Saneamento Ambiental, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* Cascavel

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Sene

CASCAVEL

FEVEREIRO – 2016

### Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

С176р
Camargo, Danielle
Produção biotecnológica de etanol a partir das frações celulósica e
hemicelulósica do bagaço de sorgo sacarino./ Danielle Camargo. Cascavel,
2016.
405 m
135 p.
Orientadora: Prof <sup>a</sup> Dr <sup>a</sup> Luciane Sene
Chentadora. 1 for . Dr . Edularie Gene
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus
de Cascavel, 2016
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola
1. Bioetanol. 2. Schefferosomyces stipitis. 3. Kluyveromyces marxianus. 4.
SSF. I.Sene, Luciane. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III.
Título.
CDD 21.ed. 333.794
CIP-NBR 12899
Ficha catalografica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9º/965

### **DANIELLE CAMARGO**

### "PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ETANOL A PARTIR DAS FRAÇÕES CELULÓSICA E HEMICELUSÓSICA DO BAGAÇO DE SORGO SACARINO"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de doutor em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, aprovada pela seguinte banca examinadora:

la

Orientadora: Prof.ª Dra, Luciane Sene

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel

Churzy)

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR/ Toledo

Ulessondra C. Nevok Sydney Prof.ª Dra. Alessandra Cristine Novak Sydney Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR/ Toledo

Profa. Dra. Marina Kimiko Kadowaki

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel

Prof.ª Dra. Simone Damasceno Gomes Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel

Cascavel, 12 de fevereiro de 2016.

### BIOGRAFIA

Danielle Camargo, nascida no dia 21 de novembro de 1984, natural de Cascavel no Paraná. Graduada em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia pela Universidade Paranaense – UNIPAR em 2007. Possui curso Técnico em Meio ambiente pelo Centro Estadual de Educação Profissional Pedro Boaretto Neto (2008). Concluiu sua especialização em Biotecnologia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE em 2009 e formou-se mestre em Engenharia Agrícola pela mesma Universidade em 2012, na área de concentração em Saneamento Ambiental, e dissertação na área de Processos fermentativos e produção de etanol de segunda geração. Possui ainda experiência na licenciatura pela Secretaria de Estado da Educação do Paraná, ministrando as disciplinas de Química, Ciências e Biologia para os ensinos fundamental e médio. Atualmente é técnica de laboratório em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – *Campus* Toledo. Ingressou em 2012 no Doutorado no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola da UNIOESTE – *Campus* Cascavel, com pesquisa na área de Aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol celulósico, na Área de Concentração em Saneamento Ambiental.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis".

Dedico este trabalho, assim como todas as minhas conquistas, à minha família, principalmente ao meu amado marido, Jairo Patrício Paulino, e aos meus pais, Antônio Dirceu e Maria Glaci, por todo amor, carinho, compreensão e apoio confiados a mim.

### AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por todas as suas bênçãos, graças, proteção e cuidado, para que eu conseguisse cumprir mais esta etapa em minha vida;

À professora Dra. Luciane Sene, pela amizade, a colaboração, o ensino, a contribuição e principalmente pela confiança durante todos os anos do doutorado;

A todos os meus familiares, principalmente meu esposo Jairo, meu pai Dirceu, à minha mãe Glaci, meus irmãos, cunhados e sobrinhos, por entenderem tantos momentos ausentes em momentos importantes e me apoiarem em momentos difíceis;

Às queridas amigas e colaboradoras Isamara, Bruna e Lillian, por todas as conversas, as palavras de incentivo e os momentos compartilhados em laboratório;

A todos os colegas de pós-graduação, pela convivência durante as aulas e os trabalhos durante a pós-graduação;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação que contribuíram para o meu aprendizado e pelo auxílio quando precisei;

Ao PGEAGRI (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola) e à UNIOESTE, pela estrutura física e os equipamentos, e principalmente aos funcionários;

Aos órgãos Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a pesquisa;

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial nas pessoas físicas da diretora Geral do *Campus* Toledo, Viviane Lobo, e ao Coordenador do Curso de Engenharia de Bioprocessos, Eduardo Bittencourt Sydney, pela redução de carga horária e pela estrutura física cedida para alguns experimentos;

Aos colegas de trabalho Carolina e Rafael, por muitos ensinamentos e cooperação durante os momentos de trabalho;

Enfim, expresso reconhecimento a todos que me apoiaram e incentivaram para que este sonho se tornasse realidade.

۷

### PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ETANOL A PARTIR DAS FRAÇÕES CELULÓSICA

### E HEMICELULÓSICA DO BAGAÇO DE SORGO SACARINO

### RESUMO

O etanol é considerado uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis, o que implica no aumento do consumo deste biocombustível. Para suprir essa demanda, pesquisas têm sido realizadas com matérias primas alternativas para complementar a produção de etanol de primeira geração. No Brasil, o sorgo sacarino está sendo estudado para ampliação do setor sucroenergético por ter crescimento rápido e possibilidade de cultivo na entressafra da cana-de-acúcar. Porém, durante o processamento do sorgo sacarino ocorre a geração do bagaço como material excedente, que é constituído principalmente por celulose e hemicelulose, e que pode ser considerado matéria-prima em potencial para bioprocessos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar o aproveitamento dos açúcares das frações hemicelulósica e celulósica do bagaço de sorgo sacarino para produção de etanol de segunda geração por leveduras fermentadoras de pentoses e hexoses, respectivamente. Após a caracterização química do bagaço de sorgo, este foi avaliado através de estudo de delineamento composto central (DCC) e superfície de resposta à hidrólise ácida branda com variações na temperatura (111; 115 e 121 °C), tempo (40; 50 e 60 min) e concentração de ácido sulfúrico (0,75; 1,25 e 1,75% m/v) a fim de encontrar a condição que propiciasse altas concentrações de açúcares e menores de compostos tóxicos no hidrolisado hemicelulósico. Após o hidrolisado ser concentrado e destoxificado, seguiu para fermentação pela levedura Schefferosomyces stipitis em biorreator a 30 °C, com kLa de 4,9 h<sup>-1</sup>, pH 5,5 e volume de 4,5 litros. A biomassa sólida (celulignina) resultante do tratamento ácido foi submetida à avaliação da porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina e seguiu para estudo da deslignificação com variação na concentração de NaOH (1; 2,5 e 4%) e tempo (20, 40 e 60 min). Após tratamento com a melhor condição de remoção da lignina, a biomassa foi submetida à hidrólise enzimática com variação na concentração de celulase NS22086 (15; 20 e 25 FPU/g) e de  $\beta$ -glicosidase NS22118 (1/3 a 2/3) e temperatura (38; 41 e 44 °C), a fim de obter as melhores taxas de sacarificação e altas concentrações de glicose. A produção de etanol a partir da fração celulósica foi então realizada com Kluyveromyces marxianus durante sacarificação simultânea à fermentação (SSF) em três diferentes temperaturas (38; 41 e 44 °C) de incubação. A composição química do bagaço variou entre 22-26% de lignina, 30-32% de hemicelulose e 32-37% de celulose. A concentração de ácido sulfúrico foi o fator que teve maior influência na formação de açúcares e hidrólise da hemicelulose e a condição que resultou na maior concentração de acúcares (14,22 g/L de xilose e 2,42 g/L de glicose) foi 1,75% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40 minutos a 121 °C. Essa mesma condição apresentou baixas quantidades de compostos tóxicos (1,34 g/L de ácido acético, 0,90 g/L de fenólicos; 124,54 mg/L de hidroximetilfurfural e 978 mg/L de furfural). A produção de etanol por S. stiptis no hidrolisado hemicelulósico resultou em uma concentração de 22 g/L de etanol, Y<sub>D/s</sub> de 0,40 g/g;  $Y_{x/s}$  de 0,28 g/g e  $Q_p$  de 0,34 g/L.h<sup>-1</sup>. No estudo de deslignificação da celulignina foi verificado que 2,5% de NaOH, 121 °C por 60 minutos foi a melhor condição na remoção de lignina (68%). Durante a hidrólise enzimática da porção celulósica foi verificado que o aumento da concentração da celulase de 15 para 25 FPU/g resultou na maior concentração de glicose. Além disso, o aumento da β-glicosidase diminui o tempo de hidrólise e o aumento da temperatura favoreceu o processo de sacarificação da celulose. A sacarificação simultânea à fermentação com K. marxianus demonstrou ser afetada pela temperatura estudada e a máxima concentração de etanol foi alcançada (9,41 g/L) com 72 horas a 41 °C. Com esses resultados, é possível considerar que o bagaço do sorgo sacarino é uma matéria prima promissora na produção de etanol de segunda geração tanto a partir da hemicelulose como de celulose.

Palavras-chave: Bioetanol; Schefferosomyces stipitis, Kluyveromyces marxianus, SSF.

### **BIOTECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF ETHANOL FROM FRACTION OF**

### CELLULOSIC AND HEMICELLULOSIC SWEET SORGHUM

### ABSTRACT

Ethanol is considered a promising alternative to fossil fuels and causes less environmental impact, which implies an increase in the consumption of biofuel. To meet this demand, research has been conducted with alternative raw materials to complement the production of first generation ethanol. In Brazil, sweet sorghum is being studied for the expansion of sugarcane industry due to its rapid growth and the possibility of cultivating it during the season-cropping of sugarcane. However, during processing of sweet sorghum for ethanol production, generation of bagasse occurs, a material composed primarily of cellulose and hemicellulose, which can be considered a potential source of feedstock for bioprocesses. Therefore, the purpose of this study was the use of the sugars from the hemicellulose and the cellulosic fractions of the sweet sorghum bagasse, for the production of second generation ethanol by pentoses and hexoses fermentation yeasts, respectively. After chemical characterization of sorghum bagasse of six cultivars, they were subjected to mild acid hydrolysis with variations in temperature (111; 115 °C and 121), time (40, 50, and 60 min) and concentration of sulfuric acid (075; 1.25 and 1.75% w/v) using a central composite design (DCC) and response surface to find the condition that is conducive to high concentrations of sugars and less toxic compounds in the hemicellulosic hydrolysate. After the hydrolysate was concentrated and detoxified, it was submitted to fermentation by the yeast Schefferosomyces stipitis in a bioreactor at 30 °C, with kLa 4.9 h<sup>-1</sup>, pH 5.5 and volume of 4.5 liters. The solid biomass (cellulignin) that resulted from the acid treatment was submitted to evaluation of the percentage of cellulose, hemicellulose and lignin and then to studies with variation in the concentration of NaOH (1; 2.5 to 4%) and time (20, 40 and 60 min). After the treatment with the best condition of removal of lignin, cellulosic biomass was subjected to enzymatic hydrolysis with variation in the concentration of cellulase NS22086 (15, 20 and 25 FPU/g) and  $\beta$ -glucosidase NS22118 (1/3 to 2/3) and temperature of 38; 41 to 44 °C, in order to obtain the best saccharification rates and high glucose concentrations. The production of ethanol from the cellulosic fraction was then carried out with Kluyveromyces marxianus, during simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at three different temperatures (38, 41 and 44 °C) for fermentation. The chemical composition between different varieties studied was similar and varied from 22-26% of lignin, from 30-32% of hemicellulose and 32-37% of cellulose. In the study of the hydrolysis conditions of hemicellulose, it was found that the acid concentration was the most important factor, and the condition that resulted in the highest concentration of sugars (14.22 g/L xylose and 2.42 g/L glucose) was 1.75% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40 minutes and 121 °C. This same condition showed low quantities of toxic compounds (1.34 g/L of acetic acid, 0.90 g/L of phenol; 124.54 mg/L of hydroxymethylfurfural and 978 mg/L furfural). The production of ethanol by S. stiptis in the hemicellulosic hydrolysate resulted in a concentration of 22 g/L ethanol, Y<sub>p/s</sub> of 0.40 g/g; Y<sub>x/s</sub> 0.28 g/g and Q<sub>p</sub> of 0.34 g/L.h<sup>-1</sup>. For the study of cellulignin delignification it was found that 2.5% NaOH for 60 minutes was the best condition for the removal of lignin (68%). During the enzymatic hydrolysis of the cellulosic portion, it was verified that the increase of cellulase from15 to 25 FPU/g resulted in higher concentration of glucose. In addition, the increase of  $\beta$ -glucosidase also resulted in the largest amount of glucose in a shorter time. The temperature also increased and accelerated the process of saccharification of cellulose. The simultaneous saccharification fermentation with K. marxianus was shown to be affected by the temperature studied, and the maximum ethanol concentration was reached (9.41 g/L) after 72 hours at 41 °C. With these results, it was possible to consider that the bagasse of sweet sorghum is a promising material in the field of second generation ethanol production both from hemicellulose and cellulose.

Keywords: Bioethanol, Schefferosomyces stipitis, Kluyveromyces marxianus, SSF

### SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	3
2.1Geral	3
2.2Específicos	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Etanol	4
3.2 Sorgo sacarino	7
3.3 Biomassa lignocelulósica	9
3.4 Etapas da produção de etanol de segunda geração	11
3.4.1 Processo fermentativo da porção hemicelulósica	13
3.4.2 Processo fermentativo da porção celulósica	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Matéria prima	23
4.2 Caracterização química do bagaço de sorgo sacarino	23
4.3 Avaliação das condições de hidrólise ácida da fração hemicelulósica do bagaço de	sorgo
sacarino	24
4.4 Determinação da recuperação de pentoses do hidrolisado hemicelulósico do	sorgo
sacarino	25
4.5 Obtenção e concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo	26
4.6 Tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo	26
4.7 Produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de sorgo sa	icarino
	27
4.7.1 Microrganismo e preparo do inoculo	21
4.7.2 Availação da termentabilidade do hidrolisado nemicelulosico de bagaço de sorgo	27
4.8 Produção de etanoi a partir da fração celulosica do bagaço de sorgo sacarino	28
4.8.1 Avaliação da deslignificação do bagaço de sorgo	20
4.8.2 Availação da hidrolise enzimalica	29
4.8.3 Microrganismo e preparo do inoculo	29
4.8.4 Sacanneação simultanea a termentação (SSF)	30
4.9 Metodos analíticos	30
4.9.1 Determinação da concentração de celobiose, xilose, glicose, arabinose e acético dicerol e etanol	acido 20
4.9.2 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural	31

4.9.5 Determinação da concentração de renois	31
4.9.4 Determinação do PH	31
4.9.5 Determinação da concentração celular	31
4.9.6 Determinação da atividade enzimática	32
4.10 Cálculos dos parâmetros fermentativos	32
4.10.1 Fator de conversão de xilose em etanol (Y <sub>P/S</sub> )	32
4.10.2 Fator de conversão de xilose em células (Y <sub>X/S</sub> )	33
4.10.3 Produtividade volumétrica em etanol (Q <sub>P</sub> )	33
4.10.4 Produção de glicose a partir da celulose (% do rendimento teórico ou	%
digestibilidade)	33
4.10.5 Fator de conversão da celulose em etanol (Y <sub>E/C</sub> )	34
4.11 Análise estatística dos resultados	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Análise da composição química das seis variedades de sorgo sacarino	35
5.2 Estudo das condições de hidrólise ácida da fração hemicelulósica do bagaço do so	rgo
sacarino	36
5.2.1 Estudo das condições de hidrólise na liberação de açúcares	36
5.2.1.1 Principais efeitos do planejamento experimental de hidrólise ácida na liberação	de
açúcares	
5.2.1.2 Análise de variância da liberação de açúcares por planejamento experimental	de
	uc
hidrólise ácida	40
hidrólise ácida 5.2.1.3 Gráfico de superfície de resposta da liberação de açúcares para planejamento	40 de
hidrólise ácida 5.2.1.3 Gráfico de superfície de resposta da liberação de açúcares para planejamento hidrólise ácida	40 de 42
hidrólise ácida 5.2.1.3 Gráfico de superfície de resposta da liberação de açúcares para planejamento hidrólise ácida 5.2.2 Condições de hidrólise na formação de compostos inibitórios	40 de 42 45
hidrólise ácida 5.2.1.3 Gráfico de superfície de resposta da liberação de açúcares para planejamento hidrólise ácida 5.2.2 Condições de hidrólise na formação de compostos inibitórios 5.2.2.1 Formação de compostos tóxicos para planejamento experimental de hidrólise áci	40 de 42 45 ida
hidrólise ácida 5.2.1.3 Gráfico de superfície de resposta da liberação de açúcares para planejamento hidrólise ácida 5.2.2 Condições de hidrólise na formação de compostos inibitórios 5.2.2.1 Formação de compostos tóxicos para planejamento experimental de hidrólise áci	40 de 42 45 ida 47
hidrólise ácida 5.2.1.3 Gráfico de superfície de resposta da liberação de açúcares para planejamento hidrólise ácida 5.2.2 Condições de hidrólise na formação de compostos inibitórios 5.2.2.1 Formação de compostos tóxicos para planejamento experimental de hidrólise ácida 5.2.2.2 Análise de variância da formação de açúcares por planejamento experimental	40 de 42 45 ida 47 de
hidrólise ácida 5.2.1.3 Gráfico de superfície de resposta da liberação de açúcares para planejamento hidrólise ácida 5.2.2 Condições de hidrólise na formação de compostos inibitórios 5.2.2.1 Formação de compostos tóxicos para planejamento experimental de hidrólise áci 5.2.2.2 Análise de variância da formação de açúcares por planejamento experimental hidrólise ácida	40 de 42 45 ida 47 de 49
hidrólise ácida 5.2.1.3 Gráfico de superfície de resposta da liberação de açúcares para planejamento hidrólise ácida 5.2.2 Condições de hidrólise na formação de compostos inibitórios 5.2.2.1 Formação de compostos tóxicos para planejamento experimental de hidrólise áci 5.2.2.2 Análise de variância da formação de açúcares por planejamento experimental hidrólise ácida 5.2.2.3 Gráfico de superfície de resposta da formação de inibidores por hidrólise ácida pa	40 de 42 45 ida 47 de 49 ara
hidrólise ácida 5.2.1.3 Gráfico de superfície de resposta da liberação de açúcares para planejamento hidrólise ácida 5.2.2 Condições de hidrólise na formação de compostos inibitórios 5.2.2.1 Formação de compostos tóxicos para planejamento experimental de hidrólise áci 5.2.2.2 Análise de variância da formação de açúcares por planejamento experimental hidrólise ácida 5.2.2.3 Gráfico de superfície de resposta da formação de inibidores por hidrólise ácida pa planejamento experimental	40 de 42 45 ida 47 de 49 ara 51
hidrólise ácida 5.2.1.3 Gráfico de superfície de resposta da liberação de açúcares para planejamento hidrólise ácida 5.2.2 Condições de hidrólise na formação de compostos inibitórios 5.2.2.1 Formação de compostos tóxicos para planejamento experimental de hidrólise áci 5.2.2.2 Análise de variância da formação de açúcares por planejamento experimental hidrólise ácida 5.2.2.3 Gráfico de superfície de resposta da formação de inibidores por hidrólise ácida pa planejamento experimental 5.2.3 Determinação da recuperação das pentoses	40 de 42 45 ida 47 de 49 ara 51 53
hidrólise ácida 5.2.1.3 Gráfico de superfície de resposta da liberação de açúcares para planejamento hidrólise ácida 5.2.2 Condições de hidrólise na formação de compostos inibitórios 5.2.2.1 Formação de compostos tóxicos para planejamento experimental de hidrólise áci 5.2.2.2 Análise de variância da formação de açúcares por planejamento experimental hidrólise ácida 5.2.2.3 Gráfico de superfície de resposta da formação de inibidores por hidrólise ácida pa planejamento experimental 5.2.3 Determinação da recuperação das pentoses	40 de 42 45 ida 47 de 49 ara 51 53 58
hidrólise ácida	40 de 42 45 ida 47 de 49 ara 51 53 58 60
hidrólise ácida	40 de 42 45 ida 47 de 49 ara 51 53 58 60 61
hidrólise ácida	40 de 42 45 ida 47 de 49 ara 51 53 58 60 61 de
hidrólise ácida	40 de 42 45 ida 47 de 49 ara 51 53 58 60 61 de 64
hidrólise ácida	40 de 42 45 ida 47 de 49 ara 51 53 58 60 61 de 64 64

5.6.3 Variação do ph da concentração de ácido acético e produção de xilitol	71
5.7 Produção de etanol a partir da fração celulósica do bagaço de sorgo	74
5.7.1 Avaliação do processo de deslignificação da porção sólida do bagaço de sorç	go
sacarino7	74
5.7.2 Avaliação da hidrólise enzimática	76
5.7.3 Sacarificação simultânea à fermentação com k. marxianus	82
5.7.3.1 Variação da concentração de açúcares e produção de etanol	82
5.7.3.2 Formação de subprodutos	86
6 CONCLUSÕES	88
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
8 REFERÊNCIAS	90
9 APÊNDICE I	09

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição química de diferentes biomassas utilizadas em estudo da produção         de bioetanol       11
Tabela 2 Valores codificados e reais para as variáveis do planejamento experimental dehidrólise ácida com quadruplicata no ponto central
Tabela 3 Composição química das diferentes variedades de bagaço de sorgo sacarino 35
Tabela 4 Matriz do planejamento 2 <sup>3</sup> com os valores codificados, reais e os resultados da concentração de açúcares
Tabela 5 Análise de variância (ANOVA) para concentração de arabinose, glicose e xilose aonível de confiança de 95%.41
Tabela 6 Matriz do planejamento 2 <sup>3</sup> com os valores codificados, reais e os resultados da concentração de ácido acético, fenóis, HMF e furfural
Tabela 7 Análise de variância (ANOVA) para concentração de ácido acético, fenóis, HMF efurfural ao nível de confiança de 95%.49
Tabela 8 Concentrações de xilose, glicose, arabinose, fenóis, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo sacarino in natura, concentrado e destoxificado, obtido por hidrólise ácida empregando 1,75% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> por 40 minutos
Tabela 9 Composição mineral do bagaço de sorgo antes e após hidrólise ácida e dos hidrolisados hemicelulósicos (original, concentrado e destoxificado)
Tabela 10 Parâmetros fermentativos obtidos durante a fermentação com S. stipitis ATCC58376 em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino e valores obtidos da literatura
Tabela 11 Rendimento de glicose obtido com diferentes temperaturas e carga enzimática nahidrólise enzimática de bagaço de sorgo sacarino80
Tabela 12 Consumo de glicose, número de células, pH e parâmetros fermentativos dos ensaios com diferentes temperaturas de SSF de bagaço de sorgo sacarino por <i>K. marxianus</i>

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema geral da metodologia utilizada nos experimentos para produção de bioetanol a partir das frações celulósica e hemicelulósica
Figura 2 Produção de etanol no mundo em 20145
Figura 3 Evolução das vendas de etanol e de gasolina entre 2004 e 2013 no Brasil6
Figura 4 Histórico da produção e de área plantada da cana-de-açúcar6
Figura 5 Histórico da produção de açúcar e etanol7
Figura 6 Parede da célula vegetal e composição química quanto à celulose, hemicelulose e lignina11
Figura 7 Fluxograma com as Etapas de Produção de Etanol de Segunda Geração 12
Figura 8 Compostos formados durante a decomposição da biomassa lignocelulósica durante a hidrólise Ácida
Figura 9 Esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras
Figura 10 Representação esquemática da ação catalítica das celulases sobre a celulose 20
Figura 11 Aspecto Físico do Bagaço de sorgo sacarino23
Figura 12 Gráfico de Pareto demonstrando o efeito estimado dos fatores investigados e suas interações sobre a concentração de arabinose, glicose e xilose ao nível de 95% de confiança
Figura 13 Superfície de resposta da concentração de arabinose a partir da hidrólise ácida do bagaço de sorgo sacarino
Figura 14 Superfície de resposta da concentração de glicose a partir da hidrólise ácida do bagaço de sorgo sacarino
Figura 15 Superfície de resposta da concentração de xilose a partir da hidrólise ácida do bagaço de sorgo sacarino
Figura 16 Gráfico de Pareto demonstrando o efeito estimado dos fatores investigados e suas interações sobre a concentração de ácido acético, fenóis, furfural e HMF ao nível de 95% de confiança

Figura 25 Porcentagem de celulose, hemicelulose, lignina na biomassa sólida residual de bagaço de sorgo após a hidrólise ácida com variação nas concentrações de ácido sulfúrico

Figura 29 Variação de ácido acético (a) e pH (b) e produção de xilitol (c) durante a fermentação com *S. stipitis* ATCC 58376 em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino ......72

### 1 INTRODUÇÃO

A oscilação de preços, a perspectiva de esgotamento e os problemas ambientais oriundos dos combustíveis fósseis têm despertado o interesse na utilização da energia de origem renovável. Nesse contexto, a utilização do etanol desponta como uma alternativa promissora para produção sustentável de energia. O Brasil, por sua vez, tem se destacado mundialmente como o segundo maior produtor de etanol, atendendo tanto o consumo interno como o externo. Além disso, as pesquisas desde a era Proálcool (Programa Nacional do Álcool) a partir de cana-de-açúcar permitiram avanços tecnológicos na obtenção de produtividade elevada e custos de produção inferiores aos dos concorrentes internacionais.

Embora a metodologia de produção de etanol a partir da fermentação de cana-deaçúcar esteja muito bem estabelecida no nosso país, é importante ressaltar que o aumento da frota de veículos e o fato do álcool ser ambientalmente menos impactante têm resultado na alta demanda por este combustível.

Nesse sentido, pesquisas com matérias primas alternativas despontam como possibilidade atraente para a ampliação do setor sucroenergético. As espécies sacarinas são preferencialmente consideradas nos estudos para suplementar a safra de cana-de-açúcar, visto que apresentam altas concentrações de açúcares que são mais facilmente extraídos e fermentáveis, com menores custos de energia e operação.

O sorgo sacarino é uma das culturas promissoras no complemento da produção de etanol, por apresentar concentração elevada de sacarose, ciclo curto de 120 dias, menor exigência nutricional e possibilidade do plantio na entressafra de cana-de-açúcar. Empresas consolidadas no mercado como a Monsanto e Institutos de pesquisas como a Embrapa estão desenvolvendo híbridos com alta produção de biomassa e elevados rendimentos de açúcar, o que aponta grande expansão da cultura para os próximos anos.

O processo de produção industrial de etanol de primeira geração a partir sorgo sacarino é muito similar ao da cana-de-açúcar e resulta no bagaço como resíduo. Porém, considerando o aumento das áreas plantadas de sorgo e da quantidade processada para produção de etanol, possivelmente ocorrerá um aumento significativo nas quantidades geradas de bagaço, que pode ser reaproveitado para produção de etanol de segunda geração.

Com isso o sorgo sacarino, que já está sendo pesquisado e cogitado como promissor para produção de etanol de primeira geração, poderia contribuir para a produção de etanol de segunda geração a partir dos resíduos oriundos da sua própria cadeia produtiva, obtendo de forma totalmente renovável um combustível com enormes vantagens em relação aos aspectos ambientais, econômicos e sociais. A integração da produção de etanol de primeira geração e segunda geração e, sobretudo, a utilização de todas as frações da biomassa lignocelulósica são fatores importantes para a implantação desse biocombustível na matriz energética nacional. Diante dessas considerações e pela escassez de estudos sobre o aproveitamento das frações celulósicas e hemicelulósicas provenientes do bagaço do sorgo sacarino para a produção de etanol, evidencia-se a importância desta pesquisa.

Para o melhor entendimento e esclarecimento das etapas envolvidas nesse trabalho, está demonstrado na Figura 1 um esquema geral da metodologia que foi utilizada nos experimentos, com as diferentes etapas empregadas no processo de produção de etanol a partir da fração celulósica e hemicelulósica.



Figura 1 Esquema geral da metodologia utilizada nos experimentos para produção de bioetanol a partir das frações celulósica e hemicelulósica.

#### 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar o bagaço do sorgo sacarino como matéria prima para produção de etanol de segunda geração.

### 2.2 Específicos

 Analisar a composição química do bagaço de diferentes cultivares de sorgo sacarino;

- Estudar a hidrólise ácida branda com variações em temperatura, tempo e concentração de ácido, empregando delineamento composto central (DCC) e superfície de resposta, de forma a obter a condição que propicie altas concentrações de açúcares e menores de compostos tóxicos no hidrolisado hemicelulósico;

- Caracterizar as frações sólidas (celulignina) após o pré-tratamento de hidrólise ácida, de forma a selecionar material com alto teor de celulose e baixos teores de hemicelulose e lignina;

 Verificar composição química do hidrolisado hemicelulósico e a necessidade do aumento de açúcares e de pré-tratamento para remoção de compostos inibitórios;

- Avaliar produção, rendimento e produtividade de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo pela levedura *Scheffersomyces stipitis;* 

 Avaliar as melhores condições de deslignificação da fração celulósica empregando diferentes concentrações de NaOH e tempo do processo de deslignificação;

 Analisar a sacarificação enzimática da celulose a partir de diferentes concentrações enzimáticas e diferentes temperaturas de hidrólise;

 Avaliar a produção de etanol durante a sacarificação simultânea à fermentação (SSF) da porção celulósica por *Kluyveromyces marxianus* em três diferentes temperaturas de fermentação.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### 3.1 Etanol

A crescente demanda por energia, preocupações sobre o abastecimento de petróleo, os preços elevados e principalmente os problemas ambientais, tais como emissões de gases de efeito estufa na queima dos combustíveis fósseis, têm impulsionado a busca por fontes renováveis de energia, tornando-se uma prioridade para os pesquisadores em todo o mundo (HILL et al., 2006; AMORES et al., 2013). Por sua vez, o setor de transporte é o responsável por uma fração significativa das emissões de gases de efeito estufa e a substituição de combustíveis derivados de petróleo por biocombustíveis, como o etanol, é uma alternativa para diminuir significativamente os impactos ambientais, além de proporcionar ganhos nos níveis sócio-econômicos (DIAS et al., 2012).

Nesse sentido, o etanol combustível tem se tornado uma "commodity" importante no mercado global de energia. O álcool etílico pode ser utilizado como combustível para motores de ignição ou como aditivo para elevar o teor de oxigênio da gasolina, permitindo a redução dos gases poluentes (principalmente CO e de hidrocarbonetos aromáticos) por meio de uma melhor combustão (SÁNCHEZ; CARDONA, 2012). Além disso, o etanol apresenta toxicidade mais baixa quando comparado a outros combustíveis, sendo prontamente biodegradável em água e solos, o que reduz a penetração após vazamentos e derrames, em comparação aos combustíveis à base de petróleo (GNANSOUNOU; DAURIAT; WYMAN, 2005).

Os Estados Unidos são atualmente o maior produtor mundial de etanol, ultrapassando 14 milhões de galões em 2014. Na segunda posição está o Brasil com uma produção de 6,190 milhões de galões. Os dois países, em conjunto, produzem 87% do etanol do mundo (RFA, 2015). A principal diferença é que matéria-prima para o etanol no Brasil é à base de cana-de-açúcar, enquanto que grãos de milho são a principal matéria-prima para o etanol nos EUA (KIM; DALE, 2004). A Figura 2 demonstra o gráfico da produção de etanol no mundo em 2014.

No Brasil, o etanol é utilizado tanto como etanol anidro, que contém 99,6% (volume) de etanol e 0,4% de água e é utilizado com 20-24% em misturas com gasolina, ou, ainda, como etanol hidratado, que contém 95,5% de etanol e 4,5% de água e utilizado diretamente como combustível puro pelos veículos (GNANSOUNOU; DAURIAT; WYMAN, 2005).

A produção de etanol no Brasil iniciou-se na década de 70, devido à escassez de petróleo e aos preços elevados, que impulsionaram o país para investir na produção de álcool combustível em larga escala. Isso permitiu diminuir sua dependência do petróleo estrangeiro e estimular a economia, reduzindo as importações e promovendo o agronegócio (FILOSO et al., 2015). Naquela época, houve o estímulo à produção de etanol com o intuito

de substituir a gasolina, com a fabricação de veículos abastecidos a etanol. Além disso, a gasolina consumida pelos usuários de veículos abastecidos pelo combustível fóssil era misturada com etanol, com o objetivo de não apenas estabilizar o preço doméstico da gasolina, mas também reduzir as emissões poluentes (MELO; SAMPAIO, 2014).



Figura 2 Produção de etanol no mundo em 2014. Fonte: (RFA, 2015)

No entanto, a partir de maio de 2003, foi implantada uma nova tecnologia nos veículos que permitiu ao consumidor abastecer com qualquer mistura entre o etanol hidratado e a gasolina. Os veículos dotados dessa tecnologia são chamados de "flex fuel" o que permitiu ao consumidor optar pelo combustível mais barato (MELO; SAMPAIO, 2014).

Ademais, a tecnologia "flex fuel" proporcionou a elevação da demanda do etanol hidratado (Figura 3). Porém, essa flexibilidade na escolha do combustível é infuenciada pelo produto mais economicamente viável para o consumidor. No entanto, é totalmente orientada pela diferença de preços do etanol. Assim, caso o mercado do etanol passe por crises de produção e de alocação de demandas, é possível que o etanol deixe de ser atrativo para o consumidor final, fazendo com que o mesmo abasteça os veículos com a gasolina. (LIMA; SOUZA, 2014).

De acordo com dados da Conab (2015), o Brasil deverá produzir 663,1 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2015/2016 em pouco mais de 9 milhões de hectares. A produção do país deve sofrer um aumento de 4,3% em relação à safra passada (Figura 4). Para a safra 2015/16, a produção de açúcar está estimada em 37,63 milhões de toneladas, o que reflete um aumento de 5,8% em relação à safra passada (Figura 5). Já a produção de etanol total para o levantamento da safra 2015/16 está estimada em 28,81 bilhões de litros, resultando no aumento 0,80% que a safra 2014/15. Deste total, 12,08

bilhões de litros deverão ser de etanol anidro e 16,73 bilhões de litros de etanol hidratado. Assim, o etanol anidro terá um decréscimo de 0,23% na produção e o etanol hidratado, um aumento de 4,54%, quando comparados com a produção da safra anterior (CONAB, 2015).



Figura 3 Evolução das vendas de etanol<sup>1</sup> e de gasolina<sup>2</sup> entre 2004 e 2013 no Brasil. <sup>1</sup>Inclui as vendas de etanol hidratado e anidro. <sup>2</sup>Inclui apenas a gasolina A. Fonte: ANP (2014).



Figura 4 Histórico da produção e de área plantada da cana-de-açúcar. Fonte: CONAB (2015).

Ao analisar as Figuras 3 e 4, nota-se que a produção de etanol no Brasil não teve aumento significativo de produção. Além disso, a produção desse combustível a partir da cana-de-açúcar divide a cadeia produtiva com o açúcar. Isso reflete na menor quantidade disponível para produção de etanol quando o preço é mais atrativo para produção de sacarose. Logo, existe uma séria necessidade de implantação de projetos que viabilizem o aumento na produção de etanol para atender a demanda interna e externa (LIMA; SOUZA, 2014).



Figura 5 Histórico da produção de açúcar e etanol. Fonte: Conab (2015).

Considerando os gráficos demonstrados e os problemas atuais da produção de etanol, é importante salientar a necessidade de buscar novas metodologias para ampliação do setor, a fim de obter uma maior produção para evitar a necessidade de importação e aumentar ainda mais o volume exportado, convertendo em rentabilidade para o país. Uma possível contribuição para a ampliação na produção de etanol pode ser realizada a partir de matérias-primas alternativas que aumentariam a quantidade produzida, auxiliando na consolidação da cadeia produtiva e ampliando o mercado mundial de energia.

Nesse sentido, a fim de permanecer um dos líderes mundiais na produção de bioenergia sustentável, na forma de etanol, o Brasil precisa investir em pesquisa básica capaz de melhorar as práticas da indústria no futuro próximo. Atualmente os programas de pesquisas estão voltados para melhorias e ampliação na prática sustentável do etanol de primeira geração e para a produção de bioetanol de segunda geração, tecnologia que está prevista para comércio nos próximos 10 a 20 anos. Tal sistema deverá ser mais eficiente e aumentar significativamente a produção de bioetanol, com os consequentes benefícios econômicos e ambientais para o Brasil e o mundo (BUCKERIDGE et al., 2012)

### 3.2 Sorgo sacarino

Atualmente, a produção de etanol no mundo se dá basicamente a partir de duas culturas: o milho e a cana-de-açúcar. Porém, com o aumento da demanda por produção de alimentos e o aumento do consumo de etanol combustível a níveis sem precedentes, matérias-primas para a produção de etanol devem se tornar mais diversificadas. Nesse sentido, o sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* L. Moench) é uma matéria-prima que contém

altas concentrações de açúcares e que podem ser diretamente convertidos em etanol por meio da fermentação (WU et al., 2010).

O sorgo sacarino é atraente para a produção de etanol por causa de suas altas concentrações de açúcares fermentescíveis e por se assemelhar à cana-de-açúcar, uma vez que o armazenamento de açúcares se localiza nos colmos, além de fornecer grande quantidade de massa verde (20-30 toneladas secas/ha). Entretanto, ele difere de maneira acentuada da cana-de-acúcar por ser cultivado a partir de sementes e apresentar um ciclo vegetativo bem mais curto (3 a 4 meses) em relação a cana-de-açúcar (12 a 22 meses). Além disso, pode ser cultivado tanto em zonas temperadas como em tropicais, pois é bem adaptado ao clima diversificado e condições do solo, além disso, necessita de 33% a 50% menos água que a cana, sendo eficiente no uso de água e baixa exigência de fertilizantes. Ademais, o sorgo sacarino produz grãos, ricos em amido, que podem ser utilizados para alimentação animal e/ou produção de etanol em processo similar ao praticado na produção do etanol de milho (BARCELOS; MAEDA; PEREIRA Jr, 2011; WU et al., 2010). O rendimento esperado do sorgo sacarino a partir de 1 ha de terras agrícolas disponíveis, com elevada produtividade, é de 50/60 toneladas de matéria fresca, dos quais 73% são água, 12,91% são acúcares (suco), 5,32% são celulose, 3,73% são hemicelulose e 2,67% são lignina (GNANSOUNOU; DAURIAT; WYMAN, 2005).

Segundo Pereira Filho et al. (2013), o emprego dessa cultura com a finalidade da produção de etanol se apresenta ideal no período de entressafra da cana-de-açúcar, em que o cultivo do sorgo sacarino seria uma alternativa técnica e econômica. Esse período ocorre de dezembro a abril e evitaria o corte antecipado de cana-de-açúcar, permitindo ampliar o período de uso das usinas de etanol em três meses.

Estudos com essa espécie no país tiveram ênfase por volta de 1975, durante o lançamento do Programa Nacional do Álcool, conhecido como PROÁLCOOL, o qual incentivava a pesquisa para a produção de etanol proveniente de diversas matérias-primas vegetais. Porém, a pesquisa estagnou e a cultura praticamente desapareceu logo após o desincentivo ao programa. Atualmente, híbridos desenvolvidos em programas de melhoramento genético dessas cultivares destinados à produção de álcool estão sendo testados com boas perspectivas de produção (BARCELOS et al., 2013; CUNHA; SEVERO FILHO, 2010).

A fim de auxiliar o desenvolvimento agrícola do sorgo sacarino e otimizar a produção de etanol, o melhoramento genético entra como uma ferramenta essencial na obtenção de cultivares com alta capacidade energética e viáveis sob os pontos de vista agronômico e industrial (SANTOS et al., 2015). Portanto, o sorgo sacarino apresenta-se como uma interessante opção complementar à cana-de-açúcar para compor a matriz energética nacional, possibilitando a expansão da área passível de utilização para produção de bioenergia e aumentar a eficiência na produção de etanol (MAY et al., 2012).

De acordo com Yu et al. (2012), o grande desafio para produção de etanol em larga escala é lidar com o bagaço (carboidratos insolúveis) remanescente após a produção de etanol a partir de açúcares solúveis. Esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de processos para conversão do bagaço em uma variedade de produtos, tais como combustíveis, produtos químicos e biomateriais.

Segundo Albuquerque et al. (2012), o caldo do sorgo sacarino pode ser utilizado na produção de etanol de primeira geração, através de processo fermentativo, enquanto suas fibras, principais componentes do bagaço, podem ser usadas como forragem para alimentação animal, co-geração de eletricidade ou matéria-prima para produção de etanol de segunda geração através de hidrólise enzimática, que transforma a celulose em açúcares fermentáveis. A lignina residual e outros componentes (não convertidos em etanol) podem ser queimados para gerar calor e energia. A produção de etanol a partir da celulose e hemicelulose tem um valor maior do que a geração de energia, pois é uma oportunidade de aumentar os rendimentos e reduzir os custos na produção de etanol (GNANSOUNOU; DAURIAT; WYMAN, 2005).

### 3.3 Biomassa lignocelulósica

A maioria dos produtos químicos utilizados atualmente em nossa sociedade provém de fontes fósseis. Porém, com o aumento contínuo dos preços desses recursos, a sua disponibilidade incerta e as preocupações ambientais da sua exploração levaram a uma demanda alternativa para produtos químicos com base em fontes renováveis (CHERUBINI; STROMMAN, 2011). Nesse sentido, o uso da biomassa lignocelulósica para a obtenção de commodities tende a se tornar cada vez mais importante na sociedade do futuro, como complemento às refinarias de petróleo de hoje (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

Uma abordagem nesse sentido é a conversão de resíduos vegetais em biocombustíveis líquidos, que incluem os bioalcoóis, tais como etanol e butanol, e o biodiesel. Atualmente, o etanol é o mais importante biocombustível líquido, e sua fabricação ocorre principalmente a partir de açúcares (sacarose) ou de matérias-primas à base de amido (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

Segundo Daystar et al. (2015), um volume de produção de 16 bilhões de galões de etanol celulósico nos padrões de combustíveis renováveis por ano até 2020 resultaria na redução total nas emissões de gases de efeito estufa em 9-10 bilhões de toneladas métricas. Além disso, o mesmo trabalho sugere que o uso de etanol celulósico reduziria a emissão dos gases de efeito estufa entre 65-77% quando comparado ao uso da gasolina.

A longo prazo, o maior potencial de produção desse combustível consiste na utilização de matérias-primas celulósicas, o que compreende resíduos de culturas, culturas

energéticas, plantas de curta rotação e resíduos florestais (WANG et al., 2012). Vários estudos estão sendo realizados empregando resíduos agrícolas como matéria-prima de baixo custo para a conversão em etanol combustível, tais como palha de trigo (SINGHANIA et al., 2014; SAHA et al., 2015), palha de arroz (BELAL, 2013; SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2014), palha de milho (GLADIS et al., 2015; BURUIANA et al., 2014) e bagaço de cana (RABELO et al., 2014; GUTIÉRREZ-RIVERA et al., 2014).

A biomassa lignocelulósica é composta por três grandes biopolímeros estruturais, denominados celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um homopolímero de cadeia linear que consiste de subunidades de glicose, unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β-1,4, com o grau de polimerização de até cerca de 10.000. Essas cadeias de celulose têm uma tendência de se ligarem entre si por pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals intra e intermolecular através dos grupos de hidroxila em suas unidades de glicose, o que promove agregações de celulose e levam a uma estrutura cristalina. Ainda, existe uma pequena porcentagem de cadeias de celulose não-organizadas, que formam a celulose amorfa (PU et al., 2013; PÉREZ et al., 2002).

A hemicelulose é um heteropolímero misto formado de hexoses como glicose, manose e galactose, e principalmente de pentoses, como xilose e arabinose (SINGH et al., 2011). Os açúcares da hemicelulose são unidos por ligações  $\beta$ -1,4 e ocasionalmente  $\beta$ -1,3. A principal diferença entre a celulose e a hemicelulose é que esta última apresenta ramificações com cadeias laterais curtas e, em contraste com a celulose, os polímeros são mais facilmente hidrolisáveis (PÉREZ et al., 2002)

A lignina é um polímero aromático, sintetizado a partir de precursores fenilpropanóides (guaiacil, siringil e p-hidroxifenil) e que apresenta alto peso molecular, estrutura irregular, além de ser altamente insolúvel e recalcitrante (WONG, 2009). Ela é responsável por 15 a 35% de biomassa das plantas e é considerada o componente mais recalcitrante entre os biopolímeros da parede celular vegetal, sendo encontrada principalmente na parede celular secundária. Ela desempenha um papel importante na resistência a patógenos, regulação da água e confere força para a integridade da estrutura da parede celular (PU et al., 2013). A Figura 6 demonstra a estrutura da célula e os componentes da parede celular descritos acima.

A variação na quantidade de celulose, hemicelulose e lignina variam de planta para planta e até mesmo das partes e idade diferentes da mesma planta (JUNCHEN; IRFAN; LIN, 2012). De uma maneira geral, as composições variam de 40-60%, 20-40% e 10-25% para celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente (LIN et al., 2010). A Tabela 1 demonstra a composição de algumas biomassas lignocelulósicas que estão sendo estudadas para produção de bioetanol.



Figura 6 Parede da célula vegetal e composição química quanto à celulose, hemicelulose e lignina.

Fonte: Zak, Blackwood, Waldrop (2006).

Tabela 1 Composição química de diferentes biomassas utilizadas em estudo da produção de bioetanol

Biomassa	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Referências
	(%)	(%)	(%)	(%)	
Bagaço de sorgo	40,42	20,05	19,79	0,49	Barcelos, Maeda,
sacarino					Pereira Jr (2011)
Sorgo forrageiro	44,10	24,70	23,20	5,80	Camargo et al. (2015)
Palha de trigo	44,20	26,50	22,40	2,80	Chen, Liu (2014)
Palha da cevada	38,00	21,30	21,30	1,00	Kim et al. (2013)
Palha de arroz	43,70	24,00	15,30	11,00	Wi et al. (2013)
Palha de milho	34,90	22,60	14,00	2,60	Bondesson, Galbe e
					Zacchl (2013)
Bagaço de cana	38,20	25,00	24,00	1,00	Amores et al. (2013)
Palha de trigo Palha da cevada Palha de arroz Palha de milho Bagaço de cana	44,20 38,00 43,70 34,90 38,20	26,50 21,30 24,00 22,60 25,00	22,40 21,30 15,30 14,00 24,00	2,80 1,00 11,00 2,60 1,00	Chen, Liu (2014) Kim et al. (2013) Wi et al. (2013) Bondesson, Galbe e Zacchl (2013) Amores et al. (2013)

### 3.4 Etapas da produção de etanol de segunda geração

O processo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos inclui etapas de pré-tratamento, hidrólise da celulose e hemicelulose em açúcares monoméricos, fermentação dos açúcares em etanol e, finalmente, destilação e purificação do etanol (JAFARI et al., 2011). A Figura 7 demonstra um fluxograma com as etapas da produção de etanol a partir da porção hemicelulósica e celulósica.

Durante o pré-tratamento, a biomassa é submetida a um conjunto de medidas físicas, térmicas ou químicas que tem por função tornar a parede celular vegetal mais suscetível às etapas seguintes (DIEN et al., 2009). Procedimentos diferentes têm sido

empregados, como, por exemplo, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, explosão de vapor, entre outros.

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído tem se mostrado mais eficaz do que outros tratamentos ácidos de hidrólise e tem sido o mais amplamente usado por apresentar alta eficiência no processo de separação dos componentes da parede celular com menor custo. Esse procedimento resulta em uma parte líquida denominada de hidrolisado hemicelulósico e uma parte sólida chamada de celulignina (DUSSÁN et al., 2014). Este método pode solubilizar a hemicelulose em açúcares monoméricos (glicose, xilose, etc) e oligômeros solúveis, melhorando, assim, a conversão da celulose (MEHMOOD et al., 2009). Além disso, durante a hidrólise ácida com ácidos concentrados, a hemicelulose e a celulose podem ser completamente hidrolisadas, resultando em elevado rendimento de açúcar monomérico. Porém, nesse caso, apresenta a desvantagem de ser altamente corrosivo e necessitar de uma etapa a mais para reciclar os ácidos, para diminuir o custo do tratamento prévio (CHATURVEDI; VERMA, 2013).



Figura 7 Fluxograma com as Etapas de Produção de Etanol de Segunda Geração.

Quando o pré-tratamento é realizado com ácido diluído, ocorre formação de uma porção sólida (celulose) e uma fração hemicelulósica líquida rica em xilose, glicose e arabinose, em que tanto sólidos e líquidos podem ser fermentados para produção de etanol. A fração líquida resultante da hidrólise com ácido diluido é composta principalmente por

pentoses, estando em maior proporção a xilose, que pode ser fermentada a etanol (CANILHA et al., 2012).

Portanto, é muito importante investigar e otimizar as estratégias para o processamento da biomassa, a fim de minimizar o custo de produção. A estratégia ideal dependerá da disponibilidade, o tipo e a composição da biomassa que será processada (GURGEL et al., 2012). As condições de pré-tratamento ótimas para uma dada biomassa vegetal são definidas como aquelas em que o melhor substrato para a hidrólise é obtido com a menor quantidade de açúcares solúveis perdida em reações secundárias (RAMOS, 2003).

Para tanto, a eficiência de custos em uma biorrefinaria é dependente da produção de açúcares de baixo custo a partir da biomassa lignocelulósica ao superar a recalcitrância da biomassa. Ou seja, deve-se concentrar esforços para desenvolver tecnologias de prétratamento da biomassa que sejam eficazes para obter o mais alto rendimento de açúcares fermentáveis a partir de fontes de biomassa com um menor custo (OH et al., 2015).

Assim estratégias de pré-tratamento precisam ser diferentes depedendo do tipo da biomassa, devido às suas diferenças nas composições e estruturas químicas. Portanto, é importante compreender a estrutura da biomassa para superar a recalcitrância durante o pré-tratamento a custos mais baixos e otimizar as condições de pré-tratamento para a geração de menos produtos inibidores que interferem com as operações a jusante, tais como a hidrólise enzimática e a fermentação microbiana (OH et al., 2015).

Além disso, o tipo de biomassa e as diferentes variáveis do processo de seu tratamento, como concentrações de ácido, temperatura empregada no processo e tempo de reação, têm influência direta sobre o aumento de açúcares solubilizados e formação de compostos inibitórios. Portanto, estudos com estes fatores, bem como diferentes biomassas, são importantes para obtenção da viabilidade econômica do processo.

### 3.4.1 Processo fermentativo da porção hemicelulósica

Em processo para a fermentação a partir da fração líquida (porção hemicelulósica) é importante considerar que, durante a hidrólise ácida, além da formação de um hidrolisado hemicelulósico rico em açúcares, ocorre também a produção de compostos, tais como furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e fenóis. Estes compostos, quando presentes em níveis elevados durante o processo fermentativo, podem ser inibitórios ao metabolismo microbiano. Portanto, é importante em uma etapa antes da fermentação conhecer e, se necessário, remover esses compostos, a fim de melhorar a eficiência da produção de etanol (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2005; DING et al., 2011; FRANDEN et al., 2013; FENG et al., 2012).

A geração de sub-produtos durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é fortemente dependente da matéria-prima e do método de pré-tratamento utilizado. As substâncias que podem atuar como inibidoras de microrganismos incluem compostos

fenólicos, compostos aromáticos, ácidos alifáticos, aldeídos, furanos e íons inorgânicos, álcoois ou outros produtos da própria fermentação (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Esse compostos tóxicos são produzidos durante o processo de hidrólise a partir da própria decomposição dos materiais lignocelulósicos. Os compostos fenólicos são produzidos a partir da degradação da lignina (BARAKAT et al., 2012), enquanto que o ácido acético é originado dos grupos acetil presentes nos polímeros de hemicelulose que são libertados durante a hidrólise (SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2013). O furfural e o hidroximetilfurfural (HMF) são provenientes da degradação das pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), respectivamente (DAGNINO et al., 2013). Na Figura 8 são mostrados os principais compostos formados durante a degradação da celulose, hemicelulose e lignina durante a hidrólise ácida.



Figura 8 Compostos formados durante a decomposição da biomassa lignocelulósica durante a hidrólise Ácida. Eonte: Palmovist, Habp-Hagerdal, (2000)

Fonte: Palmqvist, Hahn-Hagerdal, (2000).

Estudos têm demonstrado que concentrações superiores a 1,0 g/L de furfural ou HMF em processos fermentativos podem reduzir significativamente a produtividade e o rendimento de etanol, devido à toxicidade que causa às células durante a fermentação (NIGAM, 2001; BELLIDO et al., 2011; WIKANDARI et al., 2010). Além disso, estudos sugerem que o furfural tem um efeito mais drástico sobre o metabolismo celular microbiano do que o HMF (RUAN et al., 2015). O HMF provavelmente funciona como um co-inibidor da

biomassa microbiana quando presente no hidrolisado. Além disso, a inibição se intensifica a partir do efeito sinérgico entre esses dois compostos (ZHA et al., 2014).

As possíveis causas da inibição do processo fermentativo devido à presença de furfural e HMF é que esses compostos causam a atenuação da atividade de tradução e a montagem de grânulos citoplasmáticos mRNP (ribonucleoproteína mensageira). Já a combinação de furfural e HMF induz à repressão da iniciação da tradução e à formação de grânulos de estresse (IWAKI et al., 2013). Além disso, a presença de furfural ou HMF causam a inibição das enzimas álcool desidrogenase (AD), aldeído desidrogenase (ALDH) e piruvato desidrogenase (PDH), sendo que a HMF não inibe a ALDH ou PDH tão severamente como furfural, o que resulta no efeito mais brando sobre a produção de etanol (MODIG; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002).

Quanto ao ácido acético, trabalhos demonstram que a adição desse composto em pequenas concentrações resulta no aumento nos níveis finais de etanol. Porém, concentrações mais elevadas que 1,5 g/L reduzem significativamente o rendimento e a produtividade do álcool (WIKANDARI et al., 2010; GREETHAM, 2014). As possíveis causas da toxicidade do ácido acético estão ligadas a sua forma não dissociada, que pode entrar na célula por difusão através da membrana plasmática e desencadear vários efeitos tóxicos, tal como redução do pH intracelular (YLITERVO; FRANZÉN; TAHERZADEH, 2014). Ou seja, o ácido acético, na sua forma não dissociada, tem propriedades biofísicas que lhe permitem difundir passivamente para a célula através da bicamada lipídica. Além disso, estudos também sugerem que a tolerância ao ácido acético está associada com a capacidade de uma dada estirpe de gerar grandes rearranjos no seu perfil de lípidos da bicamada lípidica (LINDBERG et al., 2013). Ainda em relação ao ácido acético, o efeito sobre a produção de etanol é mais atenuante quando em pH está entre 5,0 e 5,5, pois quando a diferença entre os valores de pH internos e externos é menor, resulta numa inibição reduzida do crescimento da levedura (GRAVES et al., 2006; CASEY et al., 2010).

Uma grande quantidade de compostos fenólicos diferentes são formados a partir da degradação da lignina durante a hidrólise. Os produtos da degradação da lignina mais comuns normalmente encontrados em hidrolisados hemicelulósicos são a vanilina, siringaldeído, 4-hidroximetilbenzaldeído, ácido vanílico, ácido siringico, e ácido 4-hidroxibenzóico e 4-hidroxiacetofenona (ZHU et al., 2014; KLINKE et al., 2002). Compostos fenólicos, formados a partir de lignina, podem romper as membranas e interferir com a função de alvos intracelulares hidrofóbicos (MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009). Porém, cada composto tem diferentes alvos celulares e mecanismos inibidores nas células. Os compostos que compartilham padrões semelhantes atuam no crescimento celular e apresentam efeito inibitório e mecanismos de inibição semelhantes (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014).

Além dos efeitos individuais de cada composto, a presença dos compostos tóxicos de maneira simultânea em um processo de fementação apresenta efeito sinérgico com interação negativa, reduzindo o consumo de açúcares e, como consequência, inibem a fermentação (BELLIDO et al., 2011; PALMQVIST et al., 1999; TAHERZADEH et al., 2000; ZHU et al., 2014).

Nesse sentido, a utilização dos hidrolisados hemicelulósicos em processos fermentativos requer uma etapa prévia de destoxificação para remoção dos compostos tóxicos. Os tratamentos com alteração de pH e adsorção em carvão ativo (MUSSATTO; SANTOS; ROBERTO, 2004; CANILHA et al., 2008), extração por membrana (BRÁS et al., 2014) e resinas de troca iônica (CHANDEL et al., 2007) estão sendo estudados e demonstram bons resultados na remoção dos compostos inibitórios. Porém, a alteração de pH em conjunto com adsorção de carvão é uma das alternativa que apresenta os menores custos e bons resultados de remoção (ALVES et al., 1998, MUSSATTO; SANTOS; ROBERTO, 2004, CANILHA et al., 2010).

Com relação à produção de etanol a partir da fração hemicelulósica, é importante ressaltar que uma dificuldade se dá na busca de microrganismos que sejam capazes de produzir etanol eficientemente a partir de pentoses. Embora o mecanismo de produção de etanol esteja muito bem estabelecida por *Saccharomyces cerevisiae*, a mesma naturalmente não consegue metabolizar xilose devido à falta de enzimas específicas que metabolizem essa pentose (KIMN et al., 2013, MATSUSHIKA et al., 2013).

Nesse sentido, existem leveduras fermentadoras que naturalmente são capazes de utilizar a xilose e as hexoses, tais como *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*), *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus,* que demonstram capacidade de produção de etanol e podem ser de interesse na fermentação de materiais hemicelulósicos (SÁNCHEZ et al., 2002; SANCHEZ et al., 2004; ZHAO; TAN, 2008). Entre as leveduras fermentadoras de xilose, a *S. stipitis* é promissora na conversão de xilose em etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos (NIGAM, 2001; AGBOGBO; WENGER, 2007; CAMARGO; SENE, 2014).

A via metabólica se inicia quando a xilose entra para o interior da célula através da membrana celular. Em seguida a xilose é reduzida a xilitol em uma reação catalisada pela enzima denominada de xilose redutase (XR) na presença de NADH ou NADPH. Esta etapa é seguida da oxidação do xilitol a xilulose, catalisada pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), que requer NADP<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup>. A xilulose pode então ser fosforilada a xilulose 5-fosfato pela enzima xilulose quinase com consumo de ATP, a qual é, na sequência, convertida em piruvato por meio da conexão da via das fosfo-pentoses e será metabolizada na via Embdem-Meyerhof-Parnas (EMP). O piruvato pode ser oxidado ao entrar no ciclo Krebs (ciclo dos ácidos tricarboxílicos) (CHANDEL et al., 2012; JEFFRIES; HEADMAN; VLEET, 2009; ARISTIDOU; PENTILA, 2000). A Figura 9 demonstra esquema simplificado da produção de etanol por leveduras fermentadoras de pentoses.

Em condições anaeróbias ou em baixa taxa de oxigênio, o sistema de transferência de elétrons das leveduras é incapaz de oxidar completamente o NADH. Como consequência, pode ocorrer o aumento de concentração de NADH intracelular e este desequilíbrio entre as concentrações de NADH e NAD<sup>+</sup> leva à excreção do xilitol, o que demonstra a incapacidade de leveduras para compensar o excesso de NADH. O aumento das taxas de oxigênio permite o aumento da fermentação da xilose, devido ao papel do oxigênio como receptor final de elétrons, aliviando, assim, o desequilíbrio das duas etapas iniciais no metabolismo anaeróbio da xilose. Porém, quando o oxigênio é transferido em excesso, ocorre um desvio no fluxo piruvato a partir da via fermentativa para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, com o aumento da produção de células, e redução de etanol (LAPLACE et al., 1991).



Figura 9 Esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras. Fonte: Parajó, Domínguez, Domínguez (1998).

Além disso, a *S. stipitis* é capaz de fermentar glicose, manose, galactose e celobiose (JEFFRIES; HEADMAN; VLEET, 2009). Embora *S. stipitis* seja capaz de metabolizar glicose com alta produção a etanol, melhores rendimentos foram obtidos na fermentação com xilose, pois nesse caso as células usam o substrato para produção de etanol, enquanto que a glicose é canalizada principalmente para crescimento celular (AGBOGBO et al., 2006).

Condições como pH, temperatura e a composição do meio de cultura utilizadas em processos fermentativos são conhecidas por interferirem no processo de produção de etanol. O pH entre 4-6 tem sido relatado como ótimo para produção de etanol por *S. stipitis* (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; SLININGER et al., 1990). Parâmetros como temperatura e pH podem afetar a cinética das enzimas no metabolismo celular (UNREAN; NGUYEN, 2012).

No processo de crescimento do microrganismo, o pH pode causar uma alteração na carga da membrana celular, alterando, assim, a sua permeabilidade. Ao mesmo tempo, o pH pode também causar uma mudança no grau de ionização de várias substâncias iônicas requerida para o crescimento do microrganismo, afetando tanto a absorção de nutrientes, como o crescimento e a reprodução do microrganismo (ZHANG et al., 2014). Além disso, em pH baixo, compostos como o ácido acético podem se difundir livremente através da membrana celular e afetar o pH intracelular, como consequência, resultar numa redução do crescimento celular (JARGALSAIKHAN; SARAÇOğLU, 2008).

Em geral, a temperatura ideal relatada para crescimento dos microrganismos capazes de utilizar pentoses encontra-se na região de 25 a 33 °C (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; YAH et al., 2010). A temperatura é conhecida por afetar a atividade das enzimas e mudar a velocidade da reação. Além disso, afeta a fluidez da membrana celular e o transporte de substâncias e, por conseguinte, a mudança de temperatura também tem efeito sobre a absorção de nutrientes e secreção de metabólitos (ZHANG et al., 2014).

Para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol por *S. stipitis* ATCC 58376, as condições ótimas obtidas de pH, temperatura e agitação foram, respectivamente, de 5,25, 29 °C e 198 rpm (TAVARES, 2013).

De acordo com trabalho de Silva, Mussatto e Roberto (2010), concentrações mais elevadas de xilose que 47 g/L inibiram qualquer formação de produto por *S. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. As altas concentrações de açúcar aumentam o estresse osmótico e, portanto, reduzem o crescimento e a taxa de fermentação. Além disso, as concentrações elevadas de etanol alteram a organização da membrana celular, na qual dissipam a força protônica motriz através da membrana plasmática, o que acidifica o citoplasma e leva à morte celular (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

### 3.4.2 Processo fermentativo da porção celulósica

Após o processo de pré-tratamento que remove eficientemente a hemicelulose, ocorre a formação de um complexo sólido, composto por celulose e lignina, denominado de celulignina. Para produção eficiente de etanol a partir da fração celulósica é necessário, portanto, um processo de remoção da lignina, pois esta forma uma crosta em torno da fração de hidratos de carbono e serve como uma barreira que limita a acessibilidade das enzimas hidrolíticas, reduzindo a eficiência da hidrólise (ALVIRA et al., 2010; XU et al., 2011). Nesse sentido, para tornar os polissacaridos mais acessíveis e aumentar a eficiência da bioconversão enzimática, melhorando a hidrólise da celulose, é necessário o processo de deslignificação (OLIVEIRA et al., 2013; WANG et al., 2013; MARTÍN et al., 2012). A utilização de NaOH para deslignificação tem sido relatada na melhora da sacarificação enzimática, com aumento dos rendimentos de açúcares e redução da carga enzimática durante o processo de hidrólise (MCINTOSH; VANCOV, 2011; XU et al., 2011; BARCELOS et al., 2013.

A etapa seguinte após a deslignificação diz respeito ao processo de hidrólise enzimática propriamente dito, no qual ocorre a despolimerização da celulose em glicose. Durante essa etapa, o método mais usual é a utilização de enzimas especializadas, que quebram as ligações β-1-4-glicosídicas entre as glicoses, e são chamadas coletivamente de celulases (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008). No caso da hidrólise ácida, a celulose, apesar do baixo custo, necessita do emprego de ácidos concentrados e requer temperaturas mais elevadas para atingir altos rendimentos, semelhante ao processo de enzimas celulase, o que apresenta a desvantagem de grande formação de subprodutos, pois podem causar degradação da glucose para hidroximetilfurfural (HMF) (DUSSÁN et al., 2014).

As celulases são divididas em três sub-categorias, o que representa três tipos de atividade: endoglucanases, exoglucanases (celobiohidrolases) e β-glucosidases. As endoglucanases reduzem significativamente o grau de polimerização do substrato, atacando aleatoriamente as partes interiores da molécula, principalmente as regiões amorfas de celulose. As exoglucanases (ou celobiohidrolases), por outro lado, de maneira incremental têm como atividade encurtar a molécula pela ligação ao glucano e liberam unidades, principalmente, de celobiose. As β-glucosidases dividem o dissacarídeo celobiose em duas unidades de glicose (SUBHEDAR; GOGATE, 2013; LINDE; GALBE;ZACCHI, 2006; DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008). A Figura 10 demonstra de maneira simpificada a ação das celulases sobre a biomassa.

A hidrólise enzimática da celulose é um dos gargalos na comercialização do processo devido às baixas taxas de hidrólise e ao alto custo das enzimas (KUMAR; MURTHY, 2013). As variáveis pH, carga enzimática, percentagem de sólido, tipos de
biomassa e variação da temperatura têm sido estudadas a fim de melhorar os resultados de conversão da celulose em glicose e de obter economia no processo (MUTREJA et al., 2011; VÁSQUEZ et al., 2007; TOMAS-PEJO et al., 2008; LIN; LEE, 2011

A etapa seguinte ao processo de hidrólise constitui o processo fermentativo, ou seja, a conversão dos açúcares liberados em moléculas de interesse, tal como o etanol. O processo de fermentação pode ser conduzido de forma sequencial ao processo de hidrólise enzimática (SHF) ou, ainda, pode ocorrer de maneira simultânea, ou seja, Sacarificação Simultânea à Fermentação (SSF) (DAHNUM et al., 2015).





As principais vantagens de realizar a hidrólise enzimática em conjunto com a fermentação, em vez de uma etapa separada, é que a glicose liberada pela ação enzimática é convertida diretamente, o que reduz a inibição do produto final da hidrólise enzimática e a redução nos custos de investimento (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008). Além disso, apresenta menor risco de contaminação, devido ao menor tempo de manuseio de equipamentos (JUNCHEN; IRFAN; LIN, 2012).

O problema na operação de SHF é que a glicose e a celobiose permanecem no mesmo meio que a celulose e as celulases, e esses mono e dissacarídeos inibem a ação das enzimas (OGEDA; PETRI, 2010). A vantagem da utilização de hidrólise e fermentação de forma separada é que ambos os processos podem ser otimizados individualmente: por exemplo, temperatura ótima de 45-50 °C durante a hidrólise e de 30 °C para a fermentação, visto que ocorrem em reatores diferentes (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009).

No entanto, durante a SSF, tanto a hidrólise da celulose quanto a fermentação da glicose são realizadas em um único passo e o processo opera a 37-38 °C (JOSHI et al., 2011). As diferenças entre a temperatura ideal para a atividade da celulase e o crescimento da levedura representam um problema que precisa ser resolvido para uma eficiente SSF

(RUIZ et al., 2012). Contudo, a levedura *Kluyveromyces marxianus* tem sido reportada como promissora para a produção de etanol em temperaturas elevadas (40 a 52 °C) (CAMARGO; GOMES; SENE, 2014; HU et al., 2012; BALLESTEROS et al., 2004).

A *K. marxianus* tem sido amplamente utilizada em aplicações biotecnológicas, por apresentar como característica uma taxa mais rápida de crescimento do que qualquer microrganismo eucariótico, termotolerância, capacidade de assimilar uma grande variedade de açúcares, secreção de enzimas líticas e produção de etanol por fermentação (LANE; MORRISSEY, 2010).

Segundo Fonseca et al. (2008), estirpes pertencentes à espécie de levedura *K. marxianus* foram isolados a partir de uma grande variedade de habitats, o que resulta em uma grande diversidade metabólica e um elevado grau de polimorfismo intra-específica. Como consequência, várias aplicações biotecnológicas diferentes têm sido investigadas tais como a produção de enzimas ( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glicosidase, inulinase), de proteína, de compostos aromáticos e de etanol (incluindo a alta temperatura e os processos de sacarificação simultâneos à fermentação); redução do teor de lactose em produtos alimentícios; produção de queijo a partir de bioingredientes como soro de leite; biorremediação e como hospedeiro para a produção de proteína heteróloga.

Essa levedura é capaz de utilizar e produzir etanol a partir de uma variedade grande de substrato tais como glicose, xilose, manose, galactose, lactose (ROUHOLLAH et al., 2007; SOFIA; JOSHI; POLETTO, 2013). Além disso, apresenta ainda a capacidade de crescer e fermentar em temperaturas que variam entre 30 e 50 °C (COSTA et al., 2014; KUMAR et al., 2015).

*K. marxianus*, assim como *S. cerevisiae*, é uma levedura respiro-fermentativa (aeróbia facultativa) e pode obter energia tanto pelo ciclo do ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs) como por fermentação alcoolica. No caso de *S. cervisiae*, quando a concentração de açúcar é alta, a reação segue o sentido da fermentação, o que significa que a célula dirige, preferencialmente, piruvato para produção de etanol, mesmo obtendo menor rendimento energético; este fenômeno é chamado de efeito "crabtree". A levedura *K. marxianus* é, geralmente, classificada como "crabtree" negativa e direciona o metabolismo preferencialmente para o ciclo do ácido tricarboxílico e a geração ótima de energia (CARMO, 2013).

Rodrigues (2014), ao avaliar a influência da temperatura (30, 35, 40, 45 e 50 °C) na produção de etanol por *K. marxianus* ATCC 36907 a partir de meio sintético com 50 g/L de glicose, observou que o aumento da temperatura para 40, 45 e 50 °C favoreceu o metabolismo de glicose pela levedura e o aumento da produtividade de etanol.

Ballesteros et al. (2004), ao trabalhar com diferentes tipos de biomassa (*Populus nigra, Eucalyptus globulus*, palha de trigo, bagaço de sorgo sacarino, *Brassica carinata*) empregando a levedura *K. marxianus* estirpe CECT 10875, relataram rendimentos de etanol

promissores de 50-72% em 72-82 horas, com teor entre 16-19 g/L durante a sacarificação simultânea à fermentação realizadas a 42 °C, com 10% (m/v) da concentração de substrato e 15 FPU/g de celulase comercial.

Em leveduras termotolerantes, o aumento da temperatura estimula a modificação da estrutura dos ácidos graxos presentes na membrana celular, que incluem o aumento de tamanho da cadeia e a insaturação do ácido graxo. Além disso, também induz à formação de proteínas de choque térmico que desempenham um importante papel citoprotetor na tolerância tanto à temperatura quanto à presença de etanol (RODRIGUES, 2014).

Fatores como carga enzimática, concentração de biomassa lignocelulósica, pH, temperatura e agitação são conhecidos por afetar a produção de etanol por *K. marxianus* e são estudadas a fim de melhorar a eficiência do processo (FERREIRA et al., 2015). De uma maneira geral, carga enzimática de celulase entre 5 e 30 FPU/g, pH entre 4 e 6, agitação de 50 a 300 rpm, temperatura entre 30 e 50 °C e carga de sólidos entre 2 a 20% são utilizados em trabalhos que empregam *K. marxianus* na produção de etanol (VÁSQUEZ et al., 2007; CASTRO; ROBERTO, 2014; KANG et al., 2012; SURYAWATI et al., 2008; SAINI et al., 2015). Nesse sentido, é interessante realizar estudos com fatores como diferentes concentrações de enzimas, tipos de biomassas lignocelulósicas e temperaturas a fim de obter melhores resultados e economia no processo na produção de etanol de segunda geração a partir da porção celulósica e aproveitando a utilização integral da fibra para emprego em um contexto de biorrefinaria.

#### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 Matéria prima

A biomassa lignocelulósica utilizada nos experimentos foi o bagaço do sorgo sacarino, cedido pela CanaVialis/Monsanto de Campinas – São Paulo. A empresa realiza estudos com híbridos de sorgo e disponibilizou seis diferentes variedades denominadas de: A (CVSW 82568); B (CVSW 82158); C (CVSW 80147); D (CVSW 82028); E (CVSW 80007); e F (CVSW 81198). Todas as variedades foram colhidas na mesma época (abril/2012). Os experimentos foram realizados na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), nos Laboratórios de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAETEF) e Análises Agro-Ambientais (LAAA) – *Campus* Cascavel e na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – *Campus* Toledo, nos Laboratórios de Microbiologia e Química Orgânica.

Após a chegada das amostras, as mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos com capacidade de 50 L e congeladas a aproximadamente -4 °C até o início dos experimentos. Antes de cada procedimento experimental, as amostras eram descongeladas, trituradas em moinho de facas a uma granulometria de 50 mesh, e secas em estufa à temperatura 60 °C até peso constante. A Figura 11 mostra a biomassa de bagaço de sorgo de uma das variedades. Todas as diferentes variedades tinham aspecto visual semelhante.



Figura 11 Aspecto Físico do Bagaço de sorgo sacarino.

#### 4.2 Caracterização química do bagaço de sorgo sacarino

Para a composição química das seis variedades de bagaço de sorgo avaliou-se o teor de cinzas totais, umidade, proteínas, extrativos (lípidios) e as porcentagens de celulose,

hemicelulose e lignina (solúvel e insolúvel) conforme método descrito pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (SLUITER et al., 2008a, 2008b, 2008c). Cada etapa das metodologias utilizadas para caracterização química encontra-se descrita no Apêndice 1.

# 4.3 Avaliação das condições de hidrólise ácida da fração hemicelulósica do bagaço de sorgo sacarino

O estudo com o planejamento fatorial através do delineamento composto central (DCC) e metodologia de superfície resposta foram utilizados para avaliar a influência das variáveis: tempo, temperatura e concentração de ácido na obtenção de altas concentrações de açúcares e menores concentrações de compostos tóxicos obtidos a partir da fração hemicelulósica da biomassa de bagaço de sorgo. Os ensaios experimentais da hidrólise ácida foram realizados de acordo com o planejamento experimental utilizando o delineamento fatorial 2<sup>3</sup> com quatro repetições no ponto central.

Os experimentos foram conduzidos em autoclave, sendo que as variáveis independentes avaliadas foram o tempo de hidrólise em autoclave (40; 50 e 60 min), concentração do ácido sulfúrico (0,75; 1,25 e 1,75% m/v) e temperatura (111; 115 e 121 °C). Os valores reais e codificados para as variáveis do planejamento experimental e a matriz de planejamento utilizada durante esse estudo encontram-se dispostos na Tabela 2. Os valores das variáveis independentes foram utilizados de ensaios prévios (dados não mostrados) e a partir de valores obtidos na literatura.

Para cada ensaio foram colocados 10 g da biomassa em base seca em frascos Erlenmeyer de 500 mL, nos quais foram adicionados 200 mL de ácido sulfúrico (98% de pureza) nas concentrações testadas a uma razão entre biomassa e volume de solução ácida de 1:20 (g:ml). Após hidrólise o conteúdo foi filtrado e os hidrolisados foram armazenados a -20 °C até posterior análise dos compostos. Os hidrolisados obtidos durante os experimentos foram avaliados quanto a pH, concentração de açúcares (xilose, glicose, arabinose), fenóis, furfural, HMF e ácido acético.

Após análise dos resultados obtidos durante o DCC foi realizado um novo experimento para confirmação da concentração de açúcares e avaliar o efeito da concentração da solução ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sobre a biomassa. Os ensaios consistiram das mesmas condições realizadas durante a avaliação de hidrólise ácida, porém, havendo variação na concentração de ácido (1,45, 1,60, 1,75, 2,15 e 2,30%) durante a hidrólise e mantendo o tempo de autoclave de 40 min a 121 °C. Os hidrolisados obtidos foram avaliados quanto à concentração de açúcares (xilose, glicose, arabinose) e de compostos inibitórios (ácido acético, furfural, HMF e fenóis).

Ensalo	variavei							
	Valo	res codifi	cados	Valores reais				
	Temperatura	Tempo	Concentração	Temperatura	Tempo	Concentração		
	(T)	(TP)	do ácido (ca)	( <b>0</b> °)	(min)	do ácido (%)		
1	-1	-1	-1	111	40	0,75		
2	+1	-1	-1	121	40	0,75		
3	-1	+1	-1	111	60	0,75		
4	+1	+1	-1	121	60	0,75		
5	-1	-1	+1	111	40	1,75		
6	+1	-1	+1	121	40	1,75		
7	-1	+1	+1	111	60	1,75		
8	+1	+1	+1	121	60	1,75		
9	0	0	0	115	50	1,25		
10	0	0	0	115	50	1,25		
11	0	0	0	115	50	1,25		
12	0	0	0	115	50	1,25		

Tabela 2 Valores codificados e reais para as variáveis do planejamento experimental de hidrólise ácida com quadruplicata no ponto central

A massa sólida residual, denominada de celulignina, desse novo experimento que resultou na mais alta concentração de açúcares foi lavada com água destilada até pH próximo ao neutro e submetida às análises de celulose, hemicelulose e lignina, conforme descrito no item 4.2 para caracterização química. Para as análises estatísticas foram utilizados o software computacional Statistica, versão 7.1 (STATSOFT, 2005).

### 4.4 Determinação da recuperação de pentoses do hidrolisado hemicelulósico do sorgo sacarino

A recuperação de pentoses foi calculada a partir da percentagem de separação de pentosanas, conforme as Equações 1 e 2, após o processo de hidrólise, segundo Mussatto (2002).

$$MSP = \left(\frac{QPA * HPA}{FC * 100 * VSA}\right)$$

Equação 1

Em que:

MSP - Máxima separação de pentoses (g/L);

QPA - Quantidade de bagaço (g);

HPA - Porcentagem de hemicelulose no bagaço (%);

FC - Fator de conversão de xilana em xilose (0,88);

VSA - Volume da solução ácida (L).

$$SPO = \left(\frac{XiI * Arab}{MSP}\right) * 100$$
Equação 2

Em que:

SPO - Separação de pentoses obtidas (%);

Xil - Concentração de xilose (g/L);

Arab - Concentração de arabinose (g/L).

#### 4.5 Obtenção e concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo

Após determinação da condição que propiciou a maior concentração de xilose durante o DCC (1,75% solução de ácido sulfúrico, 40 minutos, 121 °C), esta foi então empregada na realização de nova hidrólise a fim de obter um volume final de 25 litros de hidrolisado hemicelulósico para utilização como meio na produção de etanol a partir da xilose. O ensaio foi realizado em frascos Erlenmeyer, nos quais foram adicionados 100 g bagaço de sorgo para cada 2000 ml de volume de solução ácida. Após hidrólise, o hidrolisado foi filtrado em papel filtro qualitativo e a parte líquida encaminhada para concentrador a vácuo a fim de aumentar a concentração de açúcares, principalmente a xilose. Esse processo ocorreu em concentrador a vácuo com capacidade de 2 L operando de forma descontínua à temperatura de 65 °C. O hidrolisado original foi concentração de 3X. O hidrolisado concentrado foi então caracterizado quanto a pH, concentração de açúcares (glicose, xilose, arabinose), ácido acético, furfural, HMF e fenóis.

#### 4.6 Tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo

Após a etapa de concentração, o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo seguiu para processo de destoxificação, conforme metodologia descrita por Marton et al. (2006) com modificações. Este procedimento consistiu da adição de óxido de cálcio até pH 7,0, seguida pela redução do pH até 2,5 pela adição ácido fosfórico concentrado. Após a alteração de pH, o hidrolisado foi submetido a adsorção com 2,5% (m/v) de carvão ativo com agitação em incubadora de movimento rotatório a 200 rpm, 60 °C por 1 hora. Após esse tempo, o hidrolisado foi centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos e filtrado a vácuo em filtro de porcelana com papel filtro qualitativo para a remoção do precipitado formado.

Após o processo de destoxificação, o hidrolisado foi analisado quanto ao pH, concentrações de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e compostos tóxicos, como ácido acético, hidroximetilfurfural, furfural e fenóis totais.

Também foram avaliadas, na biomassa sólida antes e após hidrólise ácida e nos hidrólisados original, concentrado e tratado, as concentrações dos íons: Cadmio (Cd); Cromo (Cr); Chumbo (Pb); Cálcio (Ca); Cobre (Cu); Ferro (Fe); Potássio (K); Magnésio (Mg); Manganês (Mn); Sódio (Na) e Zinco (Zn) através de digestão nitro-perclórica, conforme metodologia da EMBRAPA (2009), que consistiu na adição de 2 mL da mistura (2:1) de

ácidos nítrico-perclórico a 0,5 mL de amostra de hidrolisado hemicelulósico ou 100 mg de bagaço de sorgo adicionados em tubos de ensaio de micro-Kjeldahl, previamente limpos e secos e deixados em repouso, para pré-digestão, durante 16 horas. Após esse período, realizou-se a digestão das amostras em bloco digestor com a elevação gradual da temperatura até 550 °C. As amostras foram digeridas por aproximadamente 2 horas, até a total degradação de matéria orgânica, até atingirem a cor verde transparente. Os extratos foram retirados do bloco digestor e resfriados até a temperatura ambiente. O volume foi completado para 50 mL de água destilada em balão volumétrico. Após a etapa de digestão, os extratos foram submetidos à análise multielementar para a determinação dos teores de íons em espectrofotômetro de absorção atômica, marca Shimadzu, modelo 6300, e os comprimentos de onda utilizados foram característicos para cada elemento.

### 4.7 Produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de sorgo sacarino

#### 4.7.1 Microrganismo e preparo do inóculo

Para a produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico foi utilizada a levedura *Scheffersomyces stipitis* ATCC 58276 (NRRL Y-7124), adquirida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, Campinas – SP. A cultura foi conservada em meio de manutenção "Malt Extract Agar Base" (extrato de malte 30 g/L, peptona micológica 5 g/L e ágar 15 g/L), a 4 °C.

O preparo do inóculo foi realizado em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio sintético YMP (20 g/L xilose, 3 g/L extrato de malte, 3 g/L extrato de levedura, 5 g/L de peptona). O cultivo foi conduzido em incubadora rotatória (Marconi MA-240) a 200 rpm, temperatura de 30 °C, por 16 horas. Em seguida, as células foram recuperadas por centrifugação a 2000 rpm por 20 min, lavadas com água destilada estéril e após nova centrifugação, ressuspensas em água destilada estéril para, então, serem utilizadas como inóculo a uma concentração celular inicial de 0,5 g/L.

# 4.7.2 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo

O ensaio de fermentação foi conduzido em biorreator modelo Biotec – 7,5 v (Tecnal) de 7,5 litros de capacidade. O equipamento contém controlador de temperatura, agitação e aeração, sonda de pH e munido de turbinas com seis pás planas. O processo foi iniciado pelo preenchimento do fermentador com o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo concentrado e destoxificado e o volume de meio fermentativo utilizado foi de 4,5 litros. O hidrolisado hemicelulósico do bagaço de sorgo foi autoclavado a 121 °C e suplementado

com meio YMP (sem xilose) estéril, nas mesmas concentrações utilizadas para crescimento de inóculo. O pH do hidrolisado foi corrigido para 5,5 com NaOH (0,5 mol/L).

Por 16 horas foi mantida a sonda de oxigênio ionizando. Em seguida, foi iniciado o processo de fermentação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de sorgo com adição do inóculo *S. stipitis* (0,5 g/L). Durante o processo, a temperatura foi mantida a 30 °C e o pH foi monitorado durante o processo. A fermentação foi conduzida por 78 horas e amostras foram retiradas periodicamente a cada 12 horas para o acompanhamento da concentração de células, açúcares e etanol.

Antes do início da fermentação foi determinado o kLa (coeficiente de transferência de oxigênio) para 4,9 h<sup>-1</sup> (correspondentes a uma aeração de 0,25 vvm e agitação de 200 rpm), condição otimizada para produção de etanol por *S. stipitis* NRRL Y-7124 por Silva et al. (2011). O kLa foi determinado no hidrolisado hemicelulósico isento de células, sendo o oxigênio removido do meio de fermentação por borbulhamento com nitrogênio. O meio foi, então, agitado e aerado de acordo com a vazão desejada, monitorando o aumento da concentração do oxigênio dissolvido em função do tempo, e os valores calculados utilizando a forma integrada da equação proposta para o kLa. Assim, por meio da Equação 3 e dos dados experimentais obtidos, plotou-se ln (1 - C/Cs) em função do tempo (t) e obteve-se uma reta cujo coeficiente angular equivale ao valor de kLa (h<sup>-1</sup>).

$$\ln\left(1-\frac{c}{c_s}\right) = -kLa \times t$$

Onde:

C - concentração de O<sub>2</sub> no líquido;

C<sub>s</sub> - concentração de O<sub>2</sub> de saturação;

t - tempo em horas.

#### 4.8 Produção de etanol a partir da fração celulósica do bagaço de sorgo sacarino

#### 4.8.1 Avaliação da deslignificação do bagaço de sorgo

A parte sólida denominada de celulignina resultante do pré-tratamento nas condições ideais de hidrólise ácida (1,75% de ácido sulfúrico por 40 minutos a 121 °C) foi lavada vigorosamente com água e utilizada para determinar a melhor condição de deslignificação com hidróxido sódio a 121 °C em autoclave, conforme metodologia de Xu et al. (2011).

Os experimentos consistiram da adição de 4 g de biomassa e 40 mL de solução de NaOH em Erlenmeyer de 100 mL. Os tratamentos consistiram na combinação de 1,0; 2,5 e 4% de NaOH (m/v) com o tempo de reação na autoclave de 20, 40 e 60 minutos. Em seguida, o material foi filtrado e lavado com água quente até atingir a neutralidade. A

Equação 3

biomassa recuperada pelo processo de filtragem foi seca em estufa a 50 °C até peso constante e, em seguida, caracterizada quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina.

#### 4.8.2 Avaliação da hidrólise enzimática

A biomassa de bagaço de sorgo sacarino após ter passado pela hidrólise ácida com 1,75 m/v  $H_2SO_4$  e deslignificada foi submetida ao estudo da avaliação da hidrólise enzimática. A conversão da celulose do bagaço de sorgo sacarino em glicose foi realizada empregando "Cellulase complex NS22086 e  $\beta$ -glicosidase NS22118", ambas do "Novozymes Cellulosic Ethanol Enzyme Kit", doadas pela Novozymes Latin America LTDA. A atividade enzimática da celulose foi determinada e expressa em unidade de papel filtro (FPU), conforme metodologia proposta por Ghose (1987).

A avaliação da carga enzimática sobre a sacarificação da celulose do bagaço de sorgo em glicose foi realizado conforme NREL "SSF Experimental Protocols — Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation" (DOWE; MCMILLAN, 2008).

A hidrólise enzimática foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 4% (m/v) da biomassa do sorgo sacarino (celulose) em base seca juntamente com 50 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,5, 1% m/v de extrato de levedura, 2% m/v de peptona, previamente esterilizados a 121 °C por 30 minutos. A carga enzimática consistiu em três níveis de celulase, 15; 20 e 25 FPU por grama de bagaço, sendo que cada nível recebeu a adição de  $\beta$ -glicosidase na proporção de 1/3 ou 2/3 de celulase em relação à  $\beta$ -glicosidase, conforme recomendação do fabricante.

Os frascos foram mantidos em shaker a 38 °C, 150 rpm por 60 horas. Para obtenção do perfil de hidrólise foram retiradas alíquotas nos tempos: 0; 4; 12; 24 e 48 horas de reação, conforme determina a metodologia. Para parar a reação, as amostras coletadas eram colocadas em um banho de água fervente por 5 minutos para inativar a enzima. Após esse tempo, as mesmas eram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos, filtradas e o sobrenadante congelado até o momento da determinação da concentração de açúcares.

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a sacarificação da celulose do bagaço de sorgo, o mesmo experimento foi realizado também a 42 e 45 °C. Em todos os experimentos foram incluídos frascos com apenas o meio de cultivo tamponado (sem o substrato) e as enzimas, para controle. O experimento foi realizado inteiramente casualizado com 3 repetições cada.

#### 4.8.3 Microrganismo e preparo do inóculo

Para a produção de etanol a partir da porção celulósica foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 (NCYC 587), obtida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, Campinas – SP. Para a conservação da cultura e o preparo do inóculo foram utilizadas as mesmas condições descritas para *S. stipitis* no item 4.7.1, porém substituindo a xilose por glicose.

#### 4.8.4 Sacarificação simultânea à fermentação (SSF)

Para a realização dos ensaios de produção de etanol por *K. marxianus* foi empregado o processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF), empregando a carga enzimática que resultou no melhor perfil de hidrólise enzimática como descrito no item anterior.

Após a remoção da fração hemicelulósica por hidrólise ácida diluída e da deslignificação com NaOH, a fração celulósica restante foi seca em estufa a 50 °C por 2 horas e seguiu ao processo (SSF), realizado conforme metodologia utilizada por Ballesteros et al. (2004). A biomassa celulósica, após o pré-tratamento, foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL numa proporção de 8% (m/v) e, em seguida, foram autoclavados por 15 minutos a 121 °C. Na sequência, de maneira asséptica foram adicionados 50 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,5 e suplementado com 3 g/L extrato de malte, 3 g/L, extrato de levedura e 5 g/L de peptona (estéril). Então, foram adicionadas as enzimas celulase NS22086 e β-glicosidase NS22118, conforme a quantidade determinada no item anterior. Os frascos foram incubados em shaker a 38 °C, 150 rpm.

Após 4 horas de sacarificação foi adicionado o inóculo (1 g/L) de *K. marxianus* nos frascos e foram incubados em shaker a 38 °C, 150 rpm durante 96 horas, sendo que a cada 12 horas eram retiradas alíquotas para quantificação de açúcares, glicerol, ácido acético e etanol produzido. Ao final do experimento foram também avaliados pH e concentração celular. A fim de avaliar as melhores temperaturas de produção de etanol pela levedura, o mesmo experimento foi realizado nas mesmas condições descritas, porém nas temperaturas de 41 e 44 °C. O experimento foi realizado interamente casualizado com 3 repetições cada.

#### 4.9 Métodos analíticos

### 4.9.1 Determinação da concentração de celobiose, xilose, glicose, arabinose e ácido acético, glicerol e etanol

Para quantificação dos açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose) e, ácido acético, as amostras foram purificadas em cartucho "Sep Pak" C18 e analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo 20A) com detector de índice de refração, empregando coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8%) 150 x 7.8 mm, fase móvel  $H_2SO_4$  0,005 mol/L, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura do forno de 65 °C. O efluente foi filtrado a vácuo em membrana GVWP 0,45 um (MILLIPORE). As concentrações dos

açúcares, ácido acético, glicerol e etanol foram determinadas a partir de curvas padrão obtidas com padrões de alta pureza (98-99%, SIGMA e VETEC).

#### 4.9.2 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural

Para a quantificação de furfural e HMF, as amostras também foram analisadas no mesmo cromatógrafo em que foram detectados os carboidratos, porém utilizando as seguintes condições: coluna Kinetex Phenomenex, C18, 5 um, 100 Å, 150 x 4.6 mm; temperatura do forno 25 °C; detector ultravioleta (SPD-20A) a 208 nm, fase móvel acetonitrila/água na proporção (1:8) com 1% de ácido acético, fluxo de 0,8 mL/min. As amostras antes de serem injetadas foram filtradas em filtros VertiPureTM PTFE (Politetrafluoretileno) "Syringe Filters" com abertura de poros de 0,45 um e tamanho de 13 mm. As concentrações desses compostos foram correlacionadas com curvas padrão obtidas com padrões de alta pureza (99%, SIGMA).

#### 4.9.3 Determinação da concentração de fenóis

A concentração de fenóis totais nos hidrolisados foi determinada conforme o método de Folin Ciocalteu. Neste processo, foram adicionados 0,2 mL de reagente Folin Ciocalteu a 3 mL de amostra do hidrolisado. Após 5 minutos, foram adicionados 0,8 mL de solução de carbonato de sódio (150 g/L), seguido de agitação dos tubos em vórtex. As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos, e posteriormente determinadas as absorbâncias em espectrofotômetro (UV-VIS FEMTO 700 Plus) a 760 nm. Para a obtenção das concentrações, foi utilizada uma curva padrão de vanilina (Synth – 98% de pureza) (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELARAVENTOS, 1999).

#### 4.9.4 Determinação do pH

Os valores de pH dos hidrolisados foram determinados em pH-metro Luthon pH206.

#### 4.9.5 Determinação da concentração celular

A concentração do inóculo de ambas as espécies de leveduras e o crescimento durante as fermentações com *S. stipitis* foram determinados pela medida da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm. A concentração celular foi calculada por uma curva padrão que correlaciona a absorbância ao peso seco das células, a partir do cultivo em meio sintético.

Nas fermentações com *K. marxianus*, a concentração celular final foi avaliada por contagem direta em câmara de Neubauer.

#### 4.9.6 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da celulase foi determinada em termos de unidades de papel filtro ("Filter Papel Unit" – FPU) por mililitro da solução enzimática original, ou seja, FPU/mL (GHOSE, 1987).

Tubos de ensaio em duplicata contendo 50 mg de substrato (aproximadamente 1 cm x 4,55 cm de papel filtro qualitativo), 1 mL de tampão citrato 0,05 M pH 5,25 e 0,5 mL de enzima adequadamente diluída foram incubados a 50 °C por 60 minutos. Também foram incubados tubos-controle da enzima (0,5 ml da enzima diluída e 1,0 mL de tampão citrato), tubos controle do substrato (filtro de papel e 1,5 mL de tampão citrato) e um tubo correspondente ao branco (1,5 mL de tampão citrato). Os tubos com os padrões de glicose continham 0,5 mL de glicose (1,0 mg/0,5 mL a 3,35 mg/0,5 mL) e 1 mL de tampão citrato.

Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 3 mL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) e os açúcares redutores totais foram dosados segundo o método de Miller (1959), a 540 nm, em espectrofotômetro (UV-VIS FEMTO 700 Plus). Foi estimada a atividade enzimática (FPU/ml) interceptando-se o valor de 2 mg de açúcar redutor (glicose) liberado em 50 mg de papel filtro (4% de conversão), tendo sido considerada a diluição realizada a partir da solução original.

#### 4.10 Cálculos dos parâmetros fermentativos

#### 4.10.1 Fator de conversão de xilose em etanol (Y<sub>P/S</sub>)

O fator de conversão de xilose em etanol (Y<sub>P/S</sub>), expresso em g/g, foi determinado através da Equação 4:

$$Y_{p/s} = \left(\frac{\Delta P}{\Delta S}\right) = \left(\frac{P_{f} - P_{i}}{S_{i} - S_{f}}\right)$$
 Equação 4

Onde:

P<sub>i</sub> e P<sub>f</sub> - Concentração inicial e final de etanol;

S<sub>i</sub> e S<sub>f</sub> - Concentração inicial e final de substrato (xilose, glicose e arabinose).

#### 4.10.2 Fator de conversão de xilose em células (Y<sub>x/s</sub>)

$$Y_{X/S} = \left(\frac{\Delta x}{\Delta S}\right) = \left(\frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}\right)$$
Equação 5

Onde:

X<sub>i</sub> e X<sub>f</sub> - Concentração inicial e final de células;

S<sub>i</sub> e S<sub>f</sub> - Concentração inicial e final de substrato (xilose, glicose e arabinose).

### 4.10.3 Produtividade volumétrica em etanol (Qp)

A produtividade volumétrica em etanol (Qp), expressa em g/L.h<sup>-1</sup>, foi calculada através da Equação 6:

$$Q_{P} = \left(\frac{\Delta P}{\Delta t}\right) = \left(\frac{P_{f} - P_{i}}{t_{f} - t_{i}}\right)$$
Equação 6

Onde:

P<sub>i</sub> e P<sub>b</sub> - Concentração inicial e final de etanol;

t<sub>i</sub> e t<sub>f</sub> - Tempo inicial e final da fermentação.

# 4.10.4 Produção de glicose a partir da celulose (% do rendimento teórico ou % digestibilidade)

O rendimento obtido de glicose a partir da celulose durante a hidrólise enzimática foi determinado conforme a Equação 7.

Onde:

% ren - Porcentagem de rendimento;

[Glicose] - Concentração de Glicose (g/L);

[Celobiose] - Concentração celobiose (g/L);

[Biomassa] - Concentração de biomassa seca no início da fermentação (g/L);

f - Fração de celulose na biomassa seca (g/g);

O fator de multiplicação 1,053 converte celobiose em glicose equivalente;

Equação 7

O fator de multiplicação 1,111 converte celulose em glicose equivalente.

#### 4.10.5 Fator de conversão da celulose em etanol (Y<sub>E/C</sub>)

O fator de conversão de celulose em etanol por *K. marxianus* foi calculada a partir da Equação 9

% Conversão de celulose em etanol=  $\frac{[EtOH]_{f}-[EtOH]_{0}}{0.51 (f [Biomassa]1,11)}*100$  Equação 4

Onde:

[EtOH]<sub>f</sub> - Concentração de etanol no final da fermentação (g/L);

[EtOH]<sub>o</sub> - Concentração de etanol no início da fermentação (g/L), que deve ser zero;

[Biomassa] - Concentração de biomassa seca no início da fermentação (g/L);

f - Celulose fração de celulose na biomassa seca (g/g);

0.51 - Fator de conversão para glicose em etanol com base na bioquímica estequiométrica de levedura;

1,111 - Converte celulose em glicose equivalente.

### 4.11 Análise estatística dos resultados

A partir dos resultados da hidrólise ácida obtidos com o delineamento experimental empregando as variáveis de temperatura, tempo e concentração de ácido, foi determinada a melhor condição da hidrólise de bagaço de sorgo através da metodologia de superfície resposta. Para a composição dos modelos, bem como as respectivas superfícies, foram considerados os parâmetros estatisticamente significativos. A validade do modelo matemático gerado foi verificada em função dos coeficientes de regressão, bem como por meio da análise de variância.

Os ensaios das etapas de caracterização química, tratamento do hidrolisado hemicelulósico, produção de etanol a partir da porção celulósica, deslignificação, estudo da hidrólise enzimática e SSF foram realizados em triplicata, sendo utilizados ensaios inteiramente casualizados em cada etapa.

#### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 5.1 Análise da composição química das seis variedades de sorgo sacarino

A composição química das seis variedades de bagaço de sorgo sacarino está demonstrada na Tabela 3. De uma maneira geral, os valores para composição química apresentaram-se semelhantes entre si para as seis variedades da biomassa avaliada. De acordo com os resultados apresentados, ainda é possível considerar que a variedade F foi a que resultou na menor porcentagem de cinzas, extrativos e proteínas em relação às outras variedades.

Bagaço	Umidade	Cinzas	Extrativos	Proteínas	Lignina	Hemicelulose	Celulose
de	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
sorgo							
А	10,85	3,64	8,25	4,97	22,13	32,01	37,03
В	9,98	2,99	7,78	4,27	25,43	31,42	34,63
С	10,81	3,49	12,22	5,40	26,48	30,83	33,10
D	12,12	3,31	8,16	4,67	26,05	30,85	32,90
Е	9,26	4,19	9,59	5,77	23,78	31,90	35,10
F	9,45	2,28	6,46	3,52	24,78	30,69	36,08

Tabela 3 Composição química das diferentes variedades de bagaço de sorgo sacarino

A celulose correspondeu à maior porção da biomassa do bagaço de sorgo entre as variedades e variou entre 32,9 e 37,03%, enquanto que a hemicelulose e lignina estavam presentes entre 30,69-32,01% e 22,13-26,48% respectivamente. A variedade A foi a que demonstrou melhores resultados para celulose e hemicelulose, expressos em porcentagem e menor concentração de lignina.

Em trabalho realizado por Barcelos, Maeda e Pereira Jr. (2011), o bagaço de sorgo apresentou composição química de 40,42% de celulose, 20,05% de hemicelulose, 19,79% de lignina, 0,49% de cinzas e 4,49% de extrativos, enquanto Kim e Day (2011) relataram que a porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina obtida no bagaço de sorgo foram, respectivamente, de 45, 27 e 21%. As porcentagens de celulose, hemicelulose e lignina descritas por Liu et al. (2012) para bagaço de sorgo sacarino foram de 39,07; 34,57; 13,29%, respectivamente. Essa variação da composição química entre os autores e para este trabalho pode ser resultado da cultivar analisada, condições geográficas e os fatores ambientais onde a planta foi desenvolvida.

No entanto, esses resultados da composição química da biomassa de sorgo sacarino estudada no presente trabalho estão de acordo com os apresentados em outros trabalhos em que empregam biomassa lignocelulósica para obtenção de produtos como bioetanol e xilitol. Na biomassa de sorgo forrageiro estudada na produção de xilitol foi relatada uma porcentagem de celulose entre 39,5 e 44,1%, hemicelulose entre 24,7 e 27,6% e de lignina

entre 22,3 e 23,2% (CAMARGO et al., 2015). Em trabalho empregando farelo de girassol para produção biotecnológica de etanol de segunda geração, os valores obtidos para celulose, hemicelulose e lignina foram, respectivamente, de 32,93; 30,90 e 26,62% (CAMARGO; SENE, 2014). Quanto à composição do bagaço de cana-de-açúcar, biomassa amplamente explorada em bioprocessos, são relatadas porcentagens entre 38 e 42% de celulose, 27,8 a 24% de hemicelulose, e de 22 a 18% de lignina (KIM; DAY, 2011; GUILHERME et al., 2015).

Os resultados apresentados da composição química para as seis variedades de bagaço de sorgo demonstram ser essa biomassa uma boa alternativa para utilização em bioprocessos. A porcentagem de celulose apresenta-se como boa possibilidade para uso como fonte de glicose após a hidrólise desse polissacarídeo. Porém, o uso desses açúcares requer uma etapa de deslignificação para remoção do alto teor de lignina para se obter melhor rendimento na hidrólise enzimática e, consequentemente, na produção de bioetanol. A porcentagem de hemicelulose demonstra uma boa possibilidade no emprego de processos que utilizam pentoses.

# 5.2 Estudo das condições de hidrólise ácida da fração hemicelulósica do bagaço do sorgo sacarino

#### 5.2.1 Estudo das condições de hidrólise na liberação de açúcares

Na Tabela 4 estão apresentados os ensaios realizados conforme a matriz do planejamento, com as variáveis estudadas nas suas formas codificadas e reais (entre parênteses) e os resultados obtidos para pH, concentração de xilose, glicose e arabinose obtidos após a hidrólise ácida do bagaço de sorgo sacarino. A partir dos resultados demonstrados, pode-se observar que o ensaio 6, com temperatura de 121 °C, tempo de 40 minutos e concentração de ácido sulfúrico de 1,75% (m/v), resultou na maior quantidade de xilose (14,22 g/L) e glicose (2,42 g/L). Além disso, as maiores concentrações desses dois açúcares foram observadas na condição em que a concentração do ácido era mais alta, demonstrando que este fator foi o que mais interferiu na liberação destes açúcares a partir da fibra lignocelulósica. Além dele, a temperatura demonstrou ser um fator importante para obtenção de xilose com efeito significativo sobre o mesmo. A xilose foi o açúcar encontrado na maior concentração, demonstrando que a hemicelulose é a porção da fibra mais suscetível a hidrólise ácida.

Os resultados dos ensaios 9 a 12, ou seja, a quadruplicata no ponto central para ambas as variáveis dependentes estudadas, demonstram pouca variação entre os dados e indicam uma boa repetibilidade entre os resultados dos ensaios.

Ensaio	Variável							
	Temp	Tempo	Ácido	рН	Ara	Xil	Gli	
	(°C)	(minutos)	(%)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	
1	-1 (111)	-1 (40)	-1 (0,75)	1,15	2,61	2,2	1,08	
2	1 (121)	-1 (40)	-1 (0,75)	1,11	2,08	5,12	1,31	
3	-1 (111)	1 (60)	-1 (0,75)	1,13	1,92	1,75	0,69	
4	1 (121)	1 (60)	-1 (0,75)	1,18	1,61	5,24	0,38	
5	-1 (111)	-1 (40)	1 (1,75)	0,95	1,22	9,55	1,81	
6	1 (121)	-1 (40)	1 (1,75)	1,02	0,95	14,22	2,42	
7	-1 (111)	1 (60)	1 (1,75)	1,08	0,5	8,27	1,78	
8	1 (121)	1 (60)	1 (1,75)	0,94	0,45	12,41	1,96	
9	0 (115)	0 (50)	0 (1,25)	1,02	1,45	7,24	1,35	
10	0 (115)	0 (50)	0 (1,25)	1,00	1,43	7,23	1,41	
11	0 (115)	0 (50)	0 (1,25)	1,03	1,46	7,27	1,38	
12	0 (115)	0 (50)	0 (1,25)	1,03	1,47	7,26	1,39	

Tabela 4 Matriz do planejamento 2<sup>3</sup> com os valores codificados, reais e os resultados da concentração de açúcares

Temp: temperatura; Gli: glicose; Xil: xilose; Ara: arabinose.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com Poonsrisawat et al. (2013), que afirmam que a temperatura e a concentração do ácido sulfúrico sobre o bagaço de sorgo foram as variáveis que tiveram efeito significativo sobre o rendimento de glicose e xilose, enquanto o tempo de residência não teve um efeito significativo sobre o rendimento desses açúcares.

A temperatura elevada "amolece" a camada de proteção da lignina em volta das fibras da hemicelulose e permite que o ácido sulfúrico hidrolise a hemicelulose em xilose. No entanto, o tempo de reação longo e as temperaturas de reação elevadas facilmente causam a degradação de xilose em furfural (LIU et al., 2012).

Os valores de glicose obtidos no presente trabalho não foram superiores a 2,42 g/L, o que pode ser explicado pelo fato de quando a temperatura da reação é inferior a 120 °C, a glicose é originada principalmente a partir das cadeias laterais da hemicelulose, e a hidrólise da celulose nessa temperatura é pouco significativa. No entanto, com o aumento da temperatura da reação, começa a ocorrer a hidrólise da celulose e liberar glicose. Nesse sentido, o rendimento de glicose aumenta significativamente após 120 minutos a 150 °C (LIU et al., 2012). Por outro lado, baixas concentrações de glicose nos hidrolisados têm sido relatadas como fonte de açúcares para crescimento microbiano nas primeiras horas de fermentação, além de que auxiliam no aumento de rendimento de produtos como etanol e xilitol por microrganismos fermentadores de pentoses (CANILHA et al., 2008; AGBOGBO et al., 2006).

Poonsrisawat et al. (2013), ao estudarem a hidrólise do bagaço de sorgo com diferentes concentrações de ácido sulfúrico (0-3% v/v), temperaturas (120-190 °C) e tempo de hidrólise (10-30 min), obtiveram rendimento máximo de glicose e xilose de 0,234 e 0,208 g/g de substrato seco, respectivamente, na condição de pré-tratamento: 120 °C, 3% de  $H_2SO_4$ , durante 10 min. Swaminathan et al. (2015), ao estudarem o pré-tratamento de talos

de sorgo sacarino utilizando diferentes concentrações de ácidos (0,5 a 3% v/v), observaram concentração de xilose (13,65 g/L) e arabinose (2,24 g/L) semelhantes ao encontrados neste trabalho, porém relatam concentrações superiores de glicose (14,70 g/L) durante hidrólise com 1,5% de ácido sulfúrico. Mussatto e Roberto (2004), para hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com hidrólise ácida com 1% de ácido sulfúrico a 120 °C por 20 min obtiveram 16,4 g/L de xilose, 3,7 g/L de glicose e 2,6 g/L de arabinose

Neste trabalho, a maior concentração de arabinose foi obtida para os menores níveis (-1) em todas as variáveis (111 °<sup>C</sup>, 40 min, 0,75% de ácido). Diferentemente da xilose e glicose, esse açúcar demonstrou ser mais sensível à ação do ácido, com maior efeito sobre a porção da arabinoxilana, pois concentrações menores de ácido resultaram nas maiores concentrações de arabinose. A arabinose é liberada com facilidade, sendo afetada pela temperatura de reação. No entanto, como é uma das pentoses, também é fácil de ser degradada a furfural em altas temperaturas, reduzindo o rendimento de arabinose (LIU et al., 2012). Uma concentraçõe de 2,96 g/L de arabinose foi obtida a partir de talos de sorgo hidrolisados com 1% de ácido sulfúrico a 37 °C por 60 min e essa arabinose foi produzida, seja devido à hidrólise de alguns heteropolímeros presentes em frações de hemicelulose, seja devido a arabinoxilanos (SWAMINATHAN et al., 2015).

# 5.2.1.1 Principais efeitos do planejamento experimental de hidrólise ácida na liberação de açúcares

A estimativa dos efeitos principais ao nível de 95% de confiança do planejamento experimental da hidrólise ácida da fração hemicelulósica com variação da temperatura, tempo e concentração de ácido é apresentada através do gráfico de Pareto demonstrado na Figura 12 para todas as variáveis dependentes analisadas. No gráfico de Pareto os efeitos dos fatores são ordenados de forma decrescente da sua magnitude, conforme as variáveis independentes com maior efeito, estimados a partir dos dados experimentais, sendo significativas aquelas colunas que ultrapassam a linha tracejada (0,05).

Pode-se observar, a partir do diagrama de Pareto, que a variável que mais influenciou para o aumento da concentração de arabinose, glicose e xilose foi a concentração de ácido sulfúrico utilizada, seguido pelo tempo para a glicose e xilose e a temperatura para arabinose. O sinal negativo à frente dos valores nas variáveis estudadas significa que a houve redução da resposta ao passar do menor nível (-1) para o maior nível (+1). Ou seja, o sinal negativo exibido na variável concentração de ácido, tempo e temperatura para arabinose demonstra que quando passou de um nível (-1) para um nível (+1) diminuiu a resposta na concentração desse açúcar. Nesse caso, ao usar 1,75% na concentração ácido sulfúrico ao invés de 0,75% a quantidade de arabinose no hidrolisado hemicelulósico é menor. Isso provavelmente ocorreu devido à degradação desses açúcares em compostos de menor peso molecular como furfural. Nesse sentido, é ressaltada a



importância de verificar a concentração dos compostos inibitórios no hidrolisado hemicelulósico, visto que quantidades altas podem ser tóxicas aos microrganismos

Figura 12 Gráfico de Pareto demonstrando o efeito estimado dos fatores investigados e suas interações sobre a concentração de arabinose, glicose e xilose ao nível de 95% de confiança.

O sinal positivo referente à variável concentração de ácido e temperatura para xilose e concentração ácido para glicose, significa que quando esta variável passa de um nível -1 para o nível +1 a resposta desses açúcares é aumentada. Ou seja, maiores concentrações de xilose e glicose são verificadas no hidrolisado hemicelulósico usando a concentração de ácido sulfúrico de 1,75%.

Os resultados demonstraram que o aumento da concentração de ácido promoveu o aumento da quantidade de xilose e glicose liberada, enquanto que a mesma condição levou à redução da concentração de arabinose. A redução dessa pentose provavelmente se deu devido a maior sensibilidade dessa fração às condições de hidrolise, sendo, portanto parcialmente reduzido a compostos como furfural.

Ao observar o gráfico de Pareto é ainda possível verificar que todas as interações entre os fatores foram significativas ao nível de 95% de confiança, exceto entre o tempo e a

concentração de ácido sobre a produção de arabinose, que foi a única interação que não teve efeito significativo.

# 5.2.1.2 Análise de variância da liberação de açúcares por planejamento experimental de hidrólise ácida

Na Tabela 5 são apresentados os resultados da análise da variância (ANOVA) ao nível de confiança de 95% (p<0.05) para as variáveis arabinose, glicose e xilose. É possível verificar para arabinose que a temperatura, tempo e a concentração de ácido tiveram efeito significativo sobre a resposta desse açúcar, assim como as interações entre a temperatura e o tempo e entre a temperatura e a concentração de ácido. Ou seja, a interação entre tempo e concentração de ácido não tiveram efeito significativo a 5% de confiança sobre a produção de arabinose.

A quantidade de glicose no hidrolisado hemicelulósico foi significativa tanto para a temperatura, tempo e concentração de ácido, como para as interações entre todos os fatores. O mesmo aconteceu para xilose, indicando que todas as variáveis estudadas assumem papel importante para a degradação da fibra lignocelulósica em seus carboidratos.

Através da análise de variância, pelo teste F (Tabela 5), comparando-se o valor do F calculado com o F tabelado, é possível afirmar que o modelo proposto é válido e que os parâmetros da equação se ajustam aos dados experimentais em todos os casos (arabinose, glicose e xilose); com isso, demonstra-se que o modelo de primeira ordem (linear) foi significativo. Com os resultados, pode-se perceber que a falta de ajuste não foi significativa, indicando que a reta de regressão se ajusta perfeitamente aos dados experimentais e que existe uma pequena variação em torno do ajuste. Constatou-se que a regressão apresentou um coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) de 0,98; 0,99 e 0,97, respectivamente para arabinose, glicose e xilose. Ou seja, a regressão linear foi adequada tanto para arabinose, como glicose e xilose, indicando que o modelo matemático linear para a produção de açúcares foi válido para os três casos.

Para isso as equações obtidas para predizer as variáveis respostas são apresentadas em função dos termos codificados das variáveis independentes, indicando os valores estatisticamente significativos em nível de 95% de confiança para arabinose (Equação 10), glicose (Equação 11) e xilose (Equação 12). Os parâmetros estatisticamente não significativos (interação entre o tempo e concentração de ácido para arabinose) foram eliminados do modelo.

111101						
	Fonte	SQ	GL	MQ	F	р
	Temp (°C)	0,16820	1	0,16820	630,75	0,000138
	Tempo (min)	0,70805	1	0,70805	2655,19	0,000016
Ê	C.ácido (% m/v)	3,25125	1	3,25125	12192,10	0,000002
<b>b</b>	Temp (°C) X Tempo (min)	0,02420	1	0,02420	90,75	0,002453
e.	Temp (°C) X C. ácido (% m/v)	0,03380	1	0,03380	126,75	0,001503
SO	Tempo (min) X C. ácido (% m/v)	0,00045	1	0,00045	1,69	0,284757
oin	Resíduo	0,00361	5	0,00072		
rat	Falta de ajuste	0,00281	2	0,00140	5,28	0,104033
4	Erro puro	0,00080	3	0,00026		
	Total	4,18950	11			
	R <sup>2</sup>	0,989				
	Fonte	SQ	GL	MQ	F	р
	Temp (°C)	0,06301	1	0,06301	100,82	0,002103
	Tempo (min)	0,40951	1	0,40951	655,22	0,000131
•	C.ácido (% m/v)	2,54251	1	2,54251	4068,02	0,000008
Ţ	Temp ( °C X Tempo (min)	0,11761	1	0,11761	188,18	0,000838
<u>(</u>	Temp (°C) X C. ácido (% m/v)	0,09461	1	0,09461	151,38	0,001156
Se	Tempo (min) X C. ácido (% m/v)	0,08611	1	0,08611	137,78	0,001329
2	Resíduo	0,00361	5	0,00072		
5	Falta de ajuste	0,007217	2	0,00360	5,77	0,093656
-	Erro puro	0,001875	3	0,00062		
	Total	3,322447	11			
	R <sup>2</sup>	0,995				
	Fonte	SQ	GL	MQ	F	р
	Temp (°C)	25,7762	1	25,7762	162797,1	0,000000
	Tempo (min)	0,7081	1	0,7081	4471,9	0,000007
	C.ácido (% m/v)	106,4340	1	106,434	672215,1	0,000000
L)	Temp (°C) X Tempo (min)	0,1013	1	0,1013	639,5	0,000136
<u>ď</u>	Temp (°C) X C. ácido (% m/v)	0,1984	1	0,1984	1253,4	0,000050
Se	Tempo (min) X C. ácido (% m/v)	0,4050	1	0,4050	2557,9	0,000017
Ő	Resíduo	0,0035	5	0,0007		
X	Falta de ajuste	0,0030	2	0,0015	7,5	0,050175
	Erro puro	0,0005	3	0,0002		
	Total	133,6265	11			
	R <sup>2</sup>	0,978				

Tabela 5 Análise de variância (ANOVA) para concentração de arabinose, glicose e xilose ao nível de confiança de 95%

Temp: temperatura; C. ácido: Concentração de ácido; SQ: Soma Quadrática; GL: Graus de Liberdade; MQ: Média Quadrática; F: Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade de ajuste; p: Teste estatístico para estimativa do intervalo de confiança do modelo.

Arabinose (g/L) = 1,43 - 0,29 X<sub>1</sub> - 0,59 X<sub>2</sub> - 1,27 X<sub>3</sub> + 0,11 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> + 0,13 X<sub>1</sub>X<sub>3</sub> Equação 5

Glicose (g/L) = 1,41 + 0,17 X<sub>1</sub> - 0,45 X<sub>2</sub> + 1,12 X<sub>3</sub> - 0,24 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> + 0,21 X<sub>1</sub>X<sub>3</sub> + 0,20 X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> Equação 6

Xilose (g/L) = 7,22 + 3,59 X<sub>1</sub> - 0,59 X<sub>2</sub> + 7,29 X<sub>3</sub> + 0,22 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> + 0,31 X<sub>1</sub>X<sub>3</sub> - 0,45 X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> Equação 7

Sendo que:  $X_1$  é o valor codificado para temperatura,  $X_2$  é valor codificado para o tempo e  $X_3$  o valor codificado para concentração do ácido.

### 5.2.1.3 Gráfico de superfície de resposta da liberação de açúcares para planejamento de hidrólise ácida

Para uma visualização com maior clareza da influência dos fatores sobre a produção de açúcares durante a hidrólise ácida do bagaço de sorgo, as superfícies de resposta foram geradas para arabinose (Figura 13), glicose (Figura 14) e xilose (Figura 15) em função dos fatores significativos das variáveis independentes analisadas.



Figura 13 Superfície de resposta da concentração de arabinose a partir da hidrólise ácida do bagaço de sorgo sacarino.

Através da superfície de resposta, é possível verificar que a menor temperatura (111 °C), menor tempo (40 minutos) e menor concentração de ácido (0,75%) resultam na maior quantidade de arabinose no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo, demonstrando que essa pentose é uma porção do oligossacarídeo mais facilmente hidrolisável, sendo mais suscetível a condições menos severas de pré-tratamento. Ao intensificar o processo e colocar condições mais drásticas, a quantidade desse açúcar é reduzida significativamente, o que provavelmente ocorre pela degradação desse açúcar em compostos de menor peso molecular.



Figura 14 Superfície de resposta da concentração de glicose a partir da hidrólise ácida do bagaço de sorgo sacarino.

Ao analisar a superfície de resposta para glicose, pode-se perceber que a concentração do ácido e a temperatura foram os dois principais fatores de interferiram na formação de desse monossacarídeo, sendo que para estas duas variáveis independentes, o maior nível (+1) resultou em um hidrolisado com maior quantidade de glicose (Figura 14 B). A variável independente tempo não apresentou ação tão significativa para a formação de glicose, e o seu menor nível (-1) é indicado para esse processo de hidrólise. Ou seja, a redução de 60 para 40 minutos resultou em uma concentração maior desse açúcar no hidrolisado, o que é interessante, pensando-se no aumento de escala com viabilidade econômica (Figura 14 A).

Como neste estudo a concentração de glicose não foi superior a 2,5 g/L, provavelmente este resultado seja proveniente da porção hemicelulósica, ou ainda da região amorfa da celulose que foi hidrolisada, visto que esta não necessita de condições mais drásticas de ácido, temperatura ou tempo de hidrólise como a região cristalina.

O gráfico de superfície resposta para xilose demonstra que, assim como para a glicose, os fatores concentração de ácido e temperatura foram os que mais exerceram

influência para hidrólise da hemicelulose nessa pentose (Figura 15 B). Os melhores rendimentos desse açúcar foram obtidos ao utilizar, durante a hidrólise, temperatura de 121 °C e concentração de ácido de 1,75. O tempo exerceu menor influência para hidrólise da hemicelulose em xilose e, neste caso, é indicado o emprego de 40 minutos, o que representa economia no processo (Figura 15 C).



Figura 15 Superfície de resposta da concentração de xilose a partir da hidrólise ácida do bagaço de sorgo sacarino.

Com os resultados obtidos, verifica-se que as condições que devem ser empregadas no processo de hidrólise ácida a fim de obter-se um hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo rico em açúcares para utilização em processos fermentativos é: temperatura de 121 °C, tempo de 40 minutos e concentração de ácido de 1,75%. Essas condições, embora tenham proporcionado uma menor quantidade de arabinose, resultaram na melhor condição para obtenção de xilose e glicose, substratos estes que podem ser usados diretamente por microrganismos fermentadores de pentoses para a produção de subtâncias de interesse comercial, como etanol e xilitol. Porém, ressalta-se a importância da avaliação da quantidade de compostos tóxicos formados, e não somente a quantidade de açúcares.

Camargo et al. (2015), ao realizarem a hidrólise de sorgo forrageiro com ácido sulfúrico (2%) a 121 °C por 70 minutos, encontraram concentrações entre 16,76 – 17,42 g/L de xilose no hidrolisado hemicelulósico, conforme as variedades estudas. Para palha de sorgo em trabalho realizados por Sene et al. (2011) obtiveram após hidrólise ácida diluída com 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, por 10 minutos e 121 °C em reator, teores mais elevados de xilose (17,69 g/L) e menores de glicose (2,1 g/L) e arabinose (1,81 g/L) que os encontrados nesse trabalho. Téllez-Luis; Ramirez e; Vázquez (2002), ao estudarem a hidrólise da palha de sorgo com diferentes concentrações de ácido sulfúrico, obtiveram valor de 17,57 g/L de xilose, realizando a hidrólise com 2% de ácido sulfúrico por 60 minutos a 100 °C.

A quantidade obtida de xilose no presente trabalho demonstra ainda a necessidade de concentrar o hidrolisado, a fim de aumentar essa concentração até próximo a 50 g/L, quantidade relatada como ideal para ser usada com microrganismos fermentadores de pentoses com rendimentos mais promissores (SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2010; SARAÇOGLU; ÇAVUSOGLU, 1999).

#### 5.2.2 Condições de hidrólise na formação de compostos inibitórios

Na Tabela 6 estão demonstradas as concentrações dos subprodutos da degradação dos compostos lignocelulósicos que podem ser inibitórios para a atividade microbiana em processos fermentativos, tais como ácido acético, fenóis, HMF e furfural, obtidos a partir da hidrólise ácida do bagaço de sorgo e a matriz do planejamento, conforme as variáveis estudadas. Na mesma Tabela estão apresentados também temperatura (111 a 121 °C), tempo (40 a 60 minutos) e concentração de ácido sulfúrico (0,75 a 1,75% m/v), conforme os ensaios nas suas formas codificadas e reais (entre parênteses).

De acordo com os dados apresentados, foi possível verificar que a maior concentração de ácido acético foi obtida com ensaio 8 (temperatura 121 °C, 60 minutos e 1,75% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Ainda é possível verificar que esse resultado estava relacionado à maior quantidade de ácido adicionada na hidrólise, demonstrando que este fator propicia a degradação das pentoses em seus constituintes de menor peso molecular.

Ainda é possível considerar que o hidrolisado obtido no ensaio 6, na temperatura de 121 °C, 40 minutos e 1,75% de ácido sulfúrico, resultaram nas maiores concentrações de fenóis e HMF. Além disso, as maiores concentrações de fenólicos estavam relacionadas à temperatura mais elevada utilizada no processo de hidrólise. Ou seja, a degradação da lignina demonstrou-se sensível à ação dessa variável. Da mesma forma, as condições que empregaram as temperaturas mais elevadas promoveram a maior degradação da glicose em seu subproduto.

Ensaio				Variáveis			
	Temp	Tempo	Ácido	A. ácético	fenóis	HMF(g/L)	Fur
	(°C)	(minutos)	(%)	(g/L)	(g/L)	(mg/L)	(mg/L)
1	-1 (111)	-1 (40)	-1 (0,75)	0,78	0,58	40,36	403
2	1 (121)	-1 (40)	-1 (0,75)	0,85	0,79	91,23	772
3	-1 (111)	1 (60)	-1 (0,75)	0,93	0,42	52,87	481
4	1 (121)	1 (60)	-1 (0,75)	1,04	0,77	91,65	807
5	-1 (111)	-1 (40)	1 (1,75)	1,29	0,65	62,85	571
6	1 (121)	-1 (40)	1 (1,75)	1,34	0,90	124,54	978
7	-1 (111)	1 (60)	1 (1,75)	1,32	0,59	48,46	638
8	1 (121)	1 (60)	1 (1,75)	1,47	0,83	81,10	985
9	0 (115)	0 (50)	0 (1,25)	1,11	0,72	69,90	712
10	0 (115)	0 (50)	0 (1,25)	1,12	0,71	70,48	707
11	0 (115)	0 (50)	0 (1,25)	1,15	0,72	68,81	713
12	0 (115)	0 (50)	0 (1,25)	1,13	0,73	69,36	701

Tabela 6 Matriz do planejamento 2<sup>3</sup> com os valores codificados, reais e os resultados da concentração de ácido acético, fenóis, HMF e furfural

Temp: temperatura; A. acético: ácido acético; HMF: hidroximetilfurfural; Fur:furfural

Já a maior concentração de furfural foi obtida com os maiores níveis (+1) para todas as variáveis independentes estudadas. Portanto, concentrações mais elevadas de ácido (1,75%), tempo mais longo (60 minutos) e temperatura mais alta (121 °C) de hidrólise promoveram a desidratação das pentoses, uma vez que as concentrações de furfural aumentaram. Provavelmente esses valores de furfural estejam relacionados principalmente à degradação da arabinose, visto que os valores reduziram conforme a severidade das variáveis concentração de ácido e temperatura, conforme demonstrado anteriormente. De acordo com Pitarelo et al. (2012), a arabinose é o monossacarídeo mais suscetível a hidrólise e desidratação, sendo a fonte mais importante para o acúmulo de furfural no extrato aquoso.

As menores concentrações de ácido acético, HMF e furfural foram obtidas com os menores níveis para todas as variáveis (111 °C; 40 minutos e 0,75% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Para os fenóis, a menor concentração obtida foi na condição com temperatura de 111 °C; 60 minutos e 0,75% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Ao realizar estudo da otimização da hidrólise ácida de sabugo de milho Jeevan, Nelson e Rena (2011) observaram que as maiores concentrações de furfural (0,25 g/L) e HMF (0,15 g/L) no hidrolisado foram obtidas com uma condição de 130 °C, 20 min e 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Qi et al. (2008) também observaram que a taxa de reação de degradação da xilose é mais rápida e mais sensível à severidade dos fatores do que a de glicose, e que a constante cinética para degradação da xilose se dá principalmente em função da temperatura de reação e da concentração dos íons de hidrogênio.

Os resultados encontrados nesse trabalho são menores do que os obtidos por Sene et al. (2011) liberados durante a hidrólise ácida de palha sorgo, com 121 °C durante 10 minutos com 1% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, os quais obtiveram valores de ácido acético de 1,87 g/L, fenólicos de 2,12 g/L, HMF de 1,56 g/L. Os valores obtidos neste estudo são menores,

também, quando comparados aos encontrados por Ping et al. (2013), que obtiveram 2,42 g/L de ácido acético e 0,54 g/L de furfural a partir de hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho hidrolisado com ácido sulfúrico diluído (1% m/m) em autoclave a 125 °C com um tempo de residência de 1 hora. Valores semelhantes de furfural (0,29 g/L) e HMF (0,06 g/L) e superior de ácido acético (2,8 g/L) e inferior de fenólicos (0,22 g/L) foram obtidos em trabalho de Martin et al. (2007) em hidrolisado de bagaço de cana hidrolisada com 2% de ácido, a 122 °C durante 40 minutos.

### 5.2.2.1 Formação de compostos tóxicos para planejamento experimental de hidrólise ácida

A Figura 16 demonstra, através do gráfico de Pareto, a estimativa dos efeitos para os compostos inibitórios ácido acético, fenóis, furfural e HMF ao nível de 95% de confiança para o planejamento experimental com variação de temperatura, tempo e concentração de ácido sulfúrico. Para o ácido acético, todas as variáveis independentes analisadas apresentaram influência sobre o aumento da concentração desse composto, sendo que a porcentagem de ácido, seguido do tempo de hidrólise e da temperatura empregada foram as variáveis que demonstraram maior capacidade na hidrólise da porção acetil da hemicelulose. Com relação às interações entre os diferentes fatores estudados, a interação da concentração de ácido com a temperatura não teve efeito significativo sobre a formação do ácido acético.

Com relação aos compostos fenólicos, as condições de temperatura, concentração de ácido, tempo e a interação entre temperatura e tempo foram as condições que resultaram no efeito significativo deste inibidor. O aumento do nível (-1) para (+1) das variáveis temperatura, concentração de ácido e a interação entre esses dois fatores resultam no aumento da concentração dos fenólicos. Já o sinal de negativo exibido na variável do tempo significa que, quando aumenta o tempo de 40 para 60 minutos, diminui a resposta na concentração dos fenólicos. A interação entre temperatura e tempo, e entre a concentração de ácido sulfúrico e o tempo estão abaixo do limite de significância p=0,05 e podem ser considerados insignificantes no processo para esta variável estudada.

Comparando-se as barras horizontais para o HMF, pode-se perceber que a temperatura foi o parâmetro estudado mais significativo para a formação desse composto. Os parâmetros tempo e interação entre tempo e concentração de ácido, e a interação da temperatura e a concentração de ácido apresentam efeito negativo, ou seja, diminuem o valor de HMF.



Figura 16 Gráfico de Pareto demonstrando o efeito estimado dos fatores investigados e suas interações sobre a concentração de ácido acético, fenóis, furfural e HMF ao nível de 95% de confiança.

Qi et al. (2008) também observaram que a taxa de degradação de glicose é mais sensível à temperatura da reação do que a xilose e, ainda, perceberam que a energia de ativação é maior para glicose em relação à xilose. Segundo os autores, a razão para esse resultado é provavelmente o efeito de meio ácido, porque alguns produtos finais da degradação são compostos ácidos, tais como ácido fórmico e acético, e estes compostos podem afetar a taxa de degradação constante até certo ponto.

Conforme o gráfico de Pareto, a formação de furfural foi influenciada positivamente para as três variáveis estudadas (tempo, temperatura e ácido), sendo que a temperatura foi o fator mais significativo, seguido pela concentração do ácido. O tempo foi o fator que, embora tenha sido significativo, demonstrou promover a formação de furfural em menor proporção. Com relação às interações para esta variável dependente, a temperatura e o tempo foram as mais relevantes para a formação desse composto, seguidas pela interação entre temperatura e concentração de ácido. A interação entre o tempo e a concentração de ácido não foi significativa a 5%. Nesse sentido, esses foram os fatores que mais contribuíram para a degradação das pentoses. Jeevan, Nelson e Rena (2011) observaram que os níveis de furfural e HMF aumentaram com o aumento do tempo de reação, e a concentração de ácido sulfúrico durante estudos de otimização da hidrolise ácida de sabugo de milho.

# 5.2.2.2 Análise de variância da formação de açúcares por planejamento experimental de hidrólise ácida

A análise de variância (ANOVA) que evidencia a validade do modelo adotado através do teste F e o erro experimental pelo resíduo com 95% de confiança são apresentados na Tabela 7 para ácido acético, fenóis, HMF, furfural.

Tantal ao n	nvoi do connariça do co70					
	Fonte	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
	Regressão	0,4668	6	0,077812	476,40	4,95
0	Resíduo	0,0008	5	0,000163		
étio	Falta de ajuste	0,0003	2	0,00015	0,95	9,55
g/L ac	Erro puro	0,0005	3	0,00017		
й <u>с</u>	Total	0,4676	11			
Ý	$R^2$	0,98				
	Fonte	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
$\widehat{}$	Regressão	0,1738	6	0,028979	33,76	4,95
g/L	Resíduo	0,0042	5	0,000858		
() S	Falta de ajuste	0,0040	2	0,002008	21,90	9,55
, io	Erro puro	0,0002	3	0,000091		
e	Total	0,1781	11			
Щ	$R^2$	0,97				
	Fonte	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
_	Regressão	5470,441	6	911,740	51,39	4,95
F)	Resíduo	88,704	5	17,740		
<u>b</u>	Falta de ajuste	87,130	2	43,564	82,99	9,55
٨F	Erro puro	1,575	3	0,524		
Ĩ	Total	5559,146	11			
	$R^2$	0,96				
	Fonte	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
L)	Regressão	331607,7	6	55267,9	1655,50	4,95
[ð]	Resíduo	166,9	5	33,3		
al (	Falta de ajuste	76,2	2	38,1	1,26	9,55
n	Erro puro	90,7	3	30,2		
nrf	Total	331714,7	11			
ш.	$R^2$	0.99				

Tabela 7 Análise de variância (ANOVA) para concentração de ácido acético, fenóis, HMF e furfural ao nível de confiança de 95%

Temp: temperatura; C. ácido: Concentração de ácido; SQ: Soma Quadrática; GL: Graus de Liberdade; MQ: Média Quadrática; Fcal: teste F calculado para verificar a significância estatística; Ftab: valor F tabelado.

Para análise da qualidade do modelo matemático, é importante avaliar o coeficiente de determinação R<sup>2</sup>, pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas. Além disso, para que o modelo seja considerado estatisticamente significativo e possa ser utilizado para fins preditivos, o valor de F calculado deve ser maior que o F tabelado, para verificar a significância da regressão. Em contrapartida, o teste F calculado para verificar a falta de

ajuste do modelo deve apresentar um valor menor que o valor de F tabelado. Se essas duas condições forem satisfeitas, o modelo é considerado bom (RABELO, 2010).

Nesse sentido, para as variáveis dependentes ácido acético, fenólicos, HMF e furfural apresentaram respectivamente o R quadrado (R<sup>2</sup>) obtido para o modelo de regressão linear de 0,98; 0,97; 0,96 e 0,99, o que significa que mais de 96% de cada uma das variações das respostas podem ser explicadas pelo modelo.

Para quantidade de ácido acético e furfural no hidrolisado hemicelulósico, o F tabelado na regressão foi menor que o F calculado, e para falta de ajuste o F tabelado (2,3) foi maior que F calculado, indicando a validade deste modelo experimental para estas variáveis estudadas. Para o teor de fenólicos e HMF, apesar do coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>>0,96) ter sido satisfatório, demonstrando que os valores previstos e obtidos são equivalentes, o modelo evidencia falta de ajuste, visto que o F calculado foi superior ao valor F tabelado; nesse sentido, o modelo necessita ser ajustado ao nível de 95% de confiança.

Assim, o modelo linear que descreve as quantidades de ácido acético e furfural liberadas durante a hidrólise ácida da fração hemicelulósica do bagaço de sorgo sacarino é estatisticamente significativo e pode ser descrito pela Equação 13 para o ácido acético, e Equação 14 para o furfural. Vale ressaltar que o modelo linear apresentou falta de ajuste para fenólicos e HMF. Assim, um modelo quadrático deverá ser utilizado para a otimização do pré-tratamento quando se busca concentrações mais baixas ou altas desses compostos. No caso, como a prioridade desse estudo é avaliar, sobretudo, a concentração de açúcares no hidrolisado e entender se a condição escolhida apresenta compostos em concentrações elevadas que possam ser inibitórios aos microrganismos, os resultados analisados respondem satisfatoriamente, pois ele consegue prever as melhores condições de hidrólise ácida que resulta nas maiores quantidades de açúcares e as condições em que fatores podem resultar nos compostos tóxicos em baixas concentrações.

Ácido acético (g/L) = 1,12 + 0,097 X<sub>1</sub> + 0,127 X<sub>2</sub>+ 0,452 X<sub>3</sub> + 0,03 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>- 0,04 X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> Equação 8

Furfural (mg/L) = 705,66 + 362,25 X<sub>1</sub> + 46,75 X<sub>2</sub> + 177,25 X<sub>3</sub> - 25,75 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> + 14,75 X<sub>1</sub>X<sub>3</sub> Equação 9

Sendo que:  $X_1$  é o valor codificado para temperatura,  $X_2$  é o valor codificado para o tempo e  $X_3$  é o valor codificado para concentração do ácido.

### 5.2.2.3 Gráfico de superfície de resposta da formação de inibidores por hidrólise ácida para planejamento experimental

As Figuras 17, 18, 19 e 20 mostram as superfícies de resposta para concentração de ácido acético, fenólicos, HMF e furfural, respectivamente, formados durante a hidrólise ácida da fração hemicelulósica do bagaço de sorgo, sendo possível observar a influência das variáveis (temperatura, tempo e concentração de ácido) sobre as respostas. Os gráficos foram construídos considerando apenas os efeitos estatisticamente significativos ao nível de confiança de 95%, conforme exposto anteriormente.



Figura 17 Superfície de resposta para concentração de ácido acético liberada após a hidrólise ácida da fração hemicelulósica do bagaço de sorgo.



Figura 18 Superfície de resposta para concentração de compostos fenólicos totais liberada após a hidrólise ácida da fração hemicelulósica do bagaço de sorgo.



Figura 19 Superfície de resposta para concentração de HMF liberada após a hidrólise ácida da fração hemicelulósica do bagaço de sorgo.



Figura 20 Superfície de resposta para concentração de furfural liberada após a hidrólise ácida da fração hemicelulósica do bagaço de sorgo.

A partir da superfície resposta do ácido acético percebe-se que a concentração de ácido, seguido do tempo e da temperatura foram os fatores determinantes para desacetilação das heteroxilanas. O aumento dos níveis de (-1) para (+1) em todos os fatores independentes estudados propiciaram a formação deste composto.

Ao analisarmos a superfície de resposta da Figura 18 para formação de compostos fenólicos, pode-se perceber que as menores concentrações desse inibidor foram obtidos com o maior tempo de hidrólise (60 minutos) e com temperatura mais branda (111 °C), sendo que a temperatura foi o fator que se destacou para a degradação da lignina em compostos fenólicos.

Pela superfície de resposta plotada para HMF (Figura 19) pode-se perceber que as reações tendem ao melhor resultado para este estudo (menor concentração) aos níveis

mínimos do planejamento para temperatura e concentração de ácido, ou seja, quanto menor a temperatura e menor a quantidade de catalisador (ácido), menor será a quantidade de HMF. Já os menores tempos tendem a aumentar a taxa de conversão de glicose a HMF.

Os gráficos de superfície resposta que representam a formação de furfural (Figura 20) evidenciam que à medida que se aumentam os níveis dos fatores temperatura e concentração de ácido, consequentemente os valores de furfural também aumentam, indicando que para, obtenção de menores concentrações deste composto tóxico, devem ser empregados valores mais baixos para estes fatores, ou seja, temperatura mais amena e menor concentração do solvente durante os ensaios experimentais de hidrólise ácida. O tempo, por sua vez, não demonstrou ter um efeito tão drástico sobre os resultados. Isso demonstra a sensibilidade das pentoses a essas condições estudadas.

Jeevan, Nelson e Rena (2011) observaram que concentração de ácido sulfúrico superiores a 2% reduziu ligeiramente a concentração de xilose obtida no hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho, fato atribuído como resultado da degradação de xilose a furfural.

Com os resultados apresentados, é possível verificar que o ácido acético foi o inibidor que estava em maior concentração no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo seguido dos compostos fenólicos. Esses resultados demonstram a sensibilidade da celulose, hemicelulose e lignina do bagaço de sorgo aos fatores estudados durante a hidrólise. As condições mais severas propiciaram a degradação em seus constituintes de menor peso molecular.

#### 5.2.3 Determinação da recuperação das pentoses

Foi avaliada a porcentagem de recuperação de pentoses a partir do hidrolisado hemicelulósico dos diferentes ensaios durante o estudo de DCC, sendo que os resultados estão demonstrados na Figura 21. Nessa Figura, foram plotados os dados a partir da média (ensaio 9), embora os ensaios do ponto central tenham sido realizados em quadruplicata. A maior porcentagem de recuperação de pentoses foi observada no ensaio 6 (121 °C, 40 minutos e 1,75%) com total de recuperação de 77%, demonstrando que este foi o tratamento mais eficiente na hidrólise da hemicelulose. Porém, cerca de 23% da hemicelulose ainda poderia ser hidrolisada, aumentando o teor de pentoses no hidrolisado. Além disso, é possível perceber que a temperatura foi um fator de grande importância durante o processo de hidrólise, pois nos ensaios 3 (60 minutos, 111 °C e 0,75%) e 7 (60 minutos, 121 °C e 0,75%) os valores de recuperação da pentoses estavam abaixo de 25%, indicando que 75% da hemicelulose inicial ainda poderia ser hidrolisada.



Figura 21 Recuperação de pentoses entre os diferentes tratamentos de hidrólise ácida durante DCC do bagaço de sorgo sacarino.

Esses resultados estão de acordo com Reyes et al. (2013), que observaram que 40-50% da hemicelulose na madeira de pinus foi solubilizada com variação na hidrólise entre 120 a 170 °C, de 30 a 120 minutos e um pH de 2 a 12. Em trabalho de Boussarsar, Rogê e Malthlouthi (2009), o tratamento ácido do bagaço de cana obteve uma concentração máxima de açúcares redutores de 15,65 g/L (incluindo 11 g/L de xilose), o que corresponde a um rendimento de conversão de 0,22 g de xilose/g bagaço seco e correspondente a 88% da fração de hemicelulose massa seca, ao realizar a hidrólise ácida com 1% (m/m) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 °C após 20 min de tratamento.

De acordo com Pitarelo et al. (2012), a eficácia do pré-tratamento depende da interação entre alguns fatores primários, como temperatura, tempo de permanência do material no reator e teor de umidade da biomassa. Além disso, a escolha da condição de pré-tratamento (temperatura, tempo de pré-tratamento) interfere diretamente no rendimento de recuperação dos principais componentes da parede celular (celulose, hemicelulose e lignina), bem como na eficiência das etapas de sacarificação da celulose e de fermentação dos hidrolisados obtidos. Os maiores percentuais de sacarificação da celulose são, geralmente, derivados de condições mais drásticas de temperatura e tempo de permanência no reator. No entanto, elevados níveis de decomposição dos carboidratos (celulose e hemicelulose) e de condensação da lignina são obtidos sob estas condições, diminuindo o rendimento de recuperação desses componentes e promovendo o acúmulo de inibidores no meio de reação.

A recuperação máxima de pentoses a partir da biomassa lignocelulósica, com uma menor concentração de inibidor e sua subsequente conversão em etanol com rendimentos e produtividades desejadas são questões importantes para proporcionar um programa de bioetanol bem sucedido em escala industrial (CHANDEL et al., 2011).

Pela análise do conjunto dos resultados apresentados, pode-se verificar que o bagaço de sorgo se mostrou sensível às condições empregadas durante os ensaios. O tratamento de hidrólise da biomassa de sorgo sacarino com 1,75% (m/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 121 °C durante 40 minutos possibilitou, em grande parte, a solubilização da hemicelulose e a recuperação de pentoses, resultando em um hidrolisado rico em açúcares com cerca de 18 g/L de monossacarideos, contendo xilose, glicose e arabinose. Porém, para a utilização em processo fermentativo de produção de etanol com melhores rendimentos por *S. stipitis*, é indicado o aumento da concentração de açúcares totais até próximo a 50 g/L no hidrolisado.

Além disso, para o aproveitamento da quase totalidade dos componentes presentes na matéria-prima e o aumento de produção de etanol, a celulose disponível após a hidrólise se mostrou uma boa opção para ser utilizada como fonte de hexoses para produção de etanol. Porém, nesse caso é indicado um estudo de deslignificação para a remoção da lignina, visto que essa pode ser uma barreira física, impedindo a hidrólise enzimática durante a conversão de celulose a glicose.

Também foi verificada a obtenção de hidrolisado com baixas concentrações de produtos potencialmente inibidores do crescimento microbiano, tais como furfural, HMF, ácido acético e compostos fenólicos totais. Deste modo, as condições selecionadas responderam satisfatoriamente para a produção de hidrolisado a ser utilizado como meio de crescimentos para microrganismos fermentadores de pentoses. Porém, um processo de destoxificação é indicado, visto que o processo de concentração de açúcares a vácuo poderá favorecer a formação desses compostos. Além disso, o efeito sinérgico entre eles poderia reduzir os rendimentos de etanol durante a fermentação.

#### 5.2.4 Avaliação da concentração de ácido sulfúrico sobre a produção de açúcares e compostos inibitórios da fermentação

O fator que foi considerado mais importante para a produção de açúcares durante a realização do estudo através de DCC sobre a hidrólise ácida da fração hemicelulósica do bagaço de sorgo sacarino foi a concentração do ácido sulfúrico utilizado. Nesse sentido, a fim de confirmar as condições que resultaram nas maiores concentrações de açúcares e se o aumento da concentração de ácido resultaria no aumento também das pentoses, foi realizada uma nova hidrólise ácida mantendo-se constante a temperatura e o tempo que foram determinados como sendo melhores durante o DCC. Esse novo experimento consistiu da hidrólise ácida em autoclave, variando a porcentagem de ácido de 1,45, 1,60, 1,75, 2,15 e 2,30%, e mantendo-se constante a temperatura de 121 °C e o tempo de 40 minutos.

A Figura 22 demonstra a concentração de arabinose, glicose e xilose após a hidrólise ácida com variação na concentração de ácido. Pode-se perceber que o aumento da porcentagem de ácido diminuiu a concentração de arabinose (1,27 g/L), sendo que a maior concentração obtida foi durante a hidrólise com 1,45%. Esse resultado demonstra a
sensibilidade da arabinose ao solvente e que foi degradada a furfural com as condições mais drásticas utilizadas.



Figura 22 Concentração de arabinose, glicose e xilose obtidas com a variação concentração de ácido sulfúrico na hidrólise do bagaço de sorgo sacarino.

Contrariamente à arabinose, a concentração de glicose aumentou com o aumento da porcentagem de ácido utilizada durante essa hidrólise, e a maior concentração desse açúcar (3,36 g/L) foi obtida com uma porcentagem de ácido de 2,30%. Para a xilose, a porcentagem de ácido de 1,75% foi a que resultou na maior concentração dessa pentose (13,31 g/L), confirmando que esta condição escolhida é a que promove a maior ação de hidrólise sobre a hemicelulose e menor degradação desse composto a furfural. Esses resultados demonstram que os dados se confirmam ao modelo obtido para essas variáveis dependentes estudadas.

Um aumento na liberação de glicose a partir de bagaço de sorgo também foi observada por Nagaiah et al. (2015) quando a concentração de  $H_2SO_4$  foi elevada de 0,5% (3 g/L) a 1% (6 g/L) e 2% (10 g/L) hidrolisadas a 121 °C por 30 minutos. Além disso, observou-se que a concentração de glicose diminuiu para 8,5 g/L quando a concentração do ácido aumentou para 5%, pois, ocorreu a degradação dos açúcares liberados para outros compostos, tais como cisões de HMF e furfurais.

Na Figura 23 é apresentada a concentração de ácido acético e fenóis durante a hidrólise ácida com variação na concentração ácido sulfúrico entre 1,45 e 2,30%. Pode-se perceber com o gráfico apresentado que ocorre aumento da concentração de ácido acético e fenólicos conforme o aumento da concentração de ácido sulfúrico empregado. As maiores concentrações de ácido acético (1,29 g/L) e fenóis totais (1,04 g/L) foram obtidas com 2,30% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os compostos fenólicos sofreram ainda menor variação em relação às diferenças

na concentração do ácido. Esses resultados confirmam uma diferente sensibilidade entre hemicelulose e lignina durante a hidrólise ácida empregada.



Figura 23 Concentração de ácido acético e compostos fenólicos obtidos com a variação da concentração de ácido sulfúrico no hidrolisado do bagaço de sorgo sacarino.

A Figura 24 mostra a concentração de HMF e furfural durante a hidrólise ácida de bagaço de sorgo com variação na porcentagem de ácido. Pode-se perceber que esses dois inibidores sofreram influência da concentração de ácido empregada, ou seja, o aumento na porcentagem do mesmo propiciou a degradação dos açúcares em seus constituintes de menor peso molecular. A maior concentração dos compostos obtidos (158,21 mg/L HMF e 946,82 mg/L furfural) se deu durante a hidrólise com 2,30% de ácido sulfúrico.

Os resultados observados indicam que a hidrólise ácida do bagaço de sorgo utilizando a variável tempo no nível (-1) (40 minutos) e as variáveis temperatura e concentração de ácido no nível (+1) (121 °C; 1,75%), como observado no ensaio da Tabela 4, apresenta-se como a melhor condição para obtenção de um hidrolisado hemicelulósico rico em açúcares (principalmente xilose) e com concentrações moderadas de compostos inibitórios, e respondem satisfatoriamente ao modelo obtido no estudo de DCC.



Figura 24 Concentração de furfural e HMF obtidos com a concentração de ácido sulfúrico no hidrolisado do bagaço de sorgo sacarino.

## 5.3 Avaliação da celulignina

As porções sólidas residuais denominadas de celugnina, provenientes dos diferentes tratamentos de hidrólise ácida com variação na concentração de ácido sulfúrico, foram avaliadas quanto à porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina. A fim de avaliar a remoção da hemicelulose durante o primeiro tratamento (hidrólise ácida) e verificar a necessidade de um processo de deslignificação para obtenção da celulose para ser empregada no processo de fermentação de C6, as celuligninas foram caracterizadas. Os resultados obtidos para celulose, hemicelulose e lignina após a hidrólise ácida do bagaço de sorgo com 1,45, 1,60, 1,75, 2,15 e 2,30% de ácido sulfúrico (m/v) em autoclave a 121 °C por 40 minutos encontram-se dispostos na Figura 25.

De maneira geral, pode-se perceber que as porcentagens de hemicelulose residual na biomassa estava entre 12 e 15%, tendo diminuído em decorrência do aumento da concentração do ácido empregada. Quando esses resultados são comparados à biomassa original, percebe-se que houve uma redução de aproximadamentede 60%. Porém, essa porcentagem hemicelulose residual após pre-tratamento ácido é considerada ainda alta e, caso essa porção fosse hidrolisada, valores mais elevados de xilose poderiam estar presentes no hidrolisado. Contudo, caso condições mais drásticas fossem empregadas para concentração de ácido, temperatura ou tempo, pudessem solubilizar uma maior porcentagem de hemicelulose a partir da fibra original. No entanto, a partir de certo limite não haveria aumento na concentração de xilose, pois a mesma passaria a ser degradada.

Quando comparada com sua variedade "in natura", as amostras de bagaço de sorgo hidrolisadas com ácido sulfúrico apresentaram teores de celulose e lignina maiores. Essa diferença nos valores percentuais deve-se prioritariamente à remoção da hemicelulose, alterando assim a proporção dos constituintes estruturais. Porém, uma pequena variação no aumento da porcentagem de ácido utilizada nesse estudo, por sua vez, reduziu a concentração de lignina, provavelmente pela degradação a fenólicos. Já o aumento da porcentagem de ácido resultou no aumento de celulose disponível na fibra, o que se deu pela maior remoção da hemicelulose e lignina.





Os resultados obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos reportados por Castro (2011), que obteve teores de celulose de 54%, hemicelulose de 8% e lignina de 25% na biomassa da palha de arroz pré-tratada com 10% de  $H_2SO_4$ , por 30 minutos a 121 °C. Os teores de celulose de 37 e 46%; hemicelulose de 5,48 e 1,42% e 37 e 38% de liginina foram obtidas na biomassa residual de farelo e torta de girassol após hidrólise ácida com 2% ácido sulfúrico por 40 minutos a 121 °C (CAMARGO et al., 2014).

As porcentagens elevadas de celulose residual presentes após hidrólise ácida indicam boas possibilidades do uso do bagaço de sorgo como biomassa celulósica em bioprocessos para a produção de etanol de segunda geração. Nesse processo, quantidades elevadas de celulose e principalmente menores quantidades de hemicelulose e lignina são indicadas para a obtenção de melhores rendimentos de glicose durante a hidrólise enzimática, por facilitar o acesso das enzimas à fibra. De acordo com Mussatto et al. (2014), quanto menor for o conteúdo de lignina e hemicelulose na amostra, melhor a eficiência da hidrólise enzimática da celulose.

### 5.4 Concentração, destoxificação e caracterização do hidrolisado hemicelulósico

No presente trabalho, após o estudo de hidrólise ácida com variação na temperatura, tempo e concentração de ácido empregando DCC a condição que melhor favoreceu a concentração de açúcares (121 °C, 40 minutos e 1,75% de ácido) foi utilizada para realização de uma nova hidrólise ácida do bagaço de sorgo de forma a se obter aproximadamente 20 litros de hidrolisado. Esse hidrolisado foi utilizado para as fermentações de pentoses e a biomassa celulósica para a SSF. Porém, o hidrolisado hemicelulósico foi antes concentrado em evaporador rotativo à vácuo para aumentar a concentração de açúcares e destoxificado com alteração de pH e a absorção com carvão ativo. As amostras destes hidrolisados foram avaliados quanto aos teores de glicose, xilose, arabinose, fenóis, ácido acético, furfural, HMF e os resultados encontram-se na Tabela 8.

concentrado e destoxificado, obtido por hidrólise ácida empregando $1,75\%$ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> por 40 minutos							
	Hidrolisado original	Hidrolisado concentrado	Hidrolisado tratado				
Arabinose (g/L)	0,95	2,47	1,66				
Xilose (g/L)	15,22	54,35	42,05				
Glicose (g/L)	2,42	6,17	2,89				
Ácido ácético (g/L)	1,34	2,45	0,78				
Fenois (g/L)	0,9	1,85	0,65				
HMF (mg/L)	124,54	285,12	88,07				
Fur (mg/L)	950,01	2.043,09	650,12				

Tabela 8 Concentrações de xilose, glicose, arabinose, fenóis, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo sacarino in natura, concentrado e destoxificado, obtido por hidrólise ácida empregando 1,75% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 40 minutos

Foi possível verificar que os hidrolisados, após terem sido concentrados, tiveram os valores de arabinose, glicose e xilose aumentados em 2,6; 3,6 e 2,5 vezes, respectivamente, em relação ao hidrolisado in natura. Com relação aos compostos inibitórios, a proporção de aumento foi 1,8; 2,0; 2,3 e 2,15 vezes para ácido acético, fenólicos, HMF e furfural, respectivamente.

Com esses resultados, pode-se perceber que houve um maior aumento dos açúcares do que dos compostos inibitórios em relação às concentrações no hidrolisado original. Esse aumento desproporcional pode ser atribuído à volatilização dos compostos inibitórios durante a concentração do hidrolisado, visto que foi utilizada uma temperatura de 60 °C sob vácuo, considerando que o ponto de ebulição do ácido acético é de 63 °C e do furfural é de 54-55 °C, empregando pressão de 100 mmHg) (MARTINEZ, 2005).

Os resultados obtidos nesse trabalho são semelhantes aos encontrados por Antunes et al. (2014) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana após ser concentrado por 3

vezes em evaporador a vácuo, obtendo concentração de 37,43 g/L de xilose, 2,72 g/L de arabinose, 1,83 g/L de ácido acético,  $1*10^{-3}$  g/L de HMF e  $2*10^{-3}$  g/L de furfural.

Na Tabela 8 também estão expostos os resultados da concentração de açúcares e compostos tóxicos no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo após processo de destoxificação. Pode-se verificar que os compostos tóxicos foram parcialmente removidos numa proporção de aproximadamente 70% em relação ao hidrolisado concentrado. No caso dos açúcares, foi também verificada uma redução dos referidos teores, de 32; 22 e 53% para arabinose, xilose e glicose, respectivamente. O pré-tratamento para remoção dos compostos tóxicos representa um custo adicional ao processo, pois para remoção destes compostos uma quantidade média de 45 g de CaO foi adicionada para cada litro de hidrolisado a ser tratado, além da adição de ácido e gastos com energia e carvão ativo.

O hidrolisado de bagaço de cana destoxificado revelou remoção de furfural de 81%, e HMF de 61% (MILESSI et al., 2013). Uma remoção de 20; 17; 15 e 31% em relação ao hidrolisado concentrado foi observada para glicose, xilose, arabinose e ácido acético, respectivamente, no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana após ser destoxificado com mesma metodologia utilizada neste trabalho (ANTUNES et al., 2014).

Concentrações de glicose de 0,67, 1,96 e 1,69 g/L foram observadas no hidrolisado "in natura" de bagaço de cana, após concentração sob vácuo e destoxificação, respectivamente. As concentrações de xilose encontradas foram de 12,45, 36,02 e 33,03 g/L no hidrolisado original, concentrado e destoxificado, respectivamente (MILESSI et al., 2013). Nesse mesmo trabalho, a concentração de xilose, glicose e arabinose no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana aumentaram, respectivamente, de 16; 0,99 e 1,15 g/L para 81,44; 6,62 e 5,77 g/L após ser concentrado, e reduziu para 52; 3,63 e 3 g/L após destoxificação. Já a concentração de ácido acético, furfural e HMF no hidrolisado original passou de 1,05; 0,42 e 0,02 g/L para 2,92; 7,89 e 3,53 g/L após concentração a vácuo, respectivamente, enquanto que, após destoxificação, o hidrolisado apresentou 1,35; 0,001 e 0,0001 g/L (MARTINIANO et al., 2013).

# 5.5 Avaliação da concentração de metais no bagaço de sorgo sacarino e no hidrolisado

Além da composição orgânica presente na biomassa na forma de celulose, hemicelulose e lignina, também foi avaliada a composição inorgânica para o bagaço in natura, bagaço submetido à hidrólise ácida, e nos hidrolisado hemicelulósicos (original, concentrado e destoxificado) (Tabela 9). O íon que estava presente em maior quantidade foi o cálcio, em todas as condições analisadas, seguido do magnésio. As concentrações mais elevadas desses íons é considerada normal, visto que são macronutrientes e são necessários em maior quantidade para as plantas.

Tabela	9	Composição	mineral	do	bagaço	de	sorgo	antes	е	após	hidrólise	ácida	е	dos
hidrolisados hemicelulósicos (original, concentrado e destoxificado)														

	Bagaço original	Bagaço após hidrólise	Hidrolisado tratado	Hidrolisado concentrado	Hidrolisado destoxificado
Cd (ppm)	0,11	0,195	0,165	0,21	0,13
Cr (ppm)	2,92	3,22	1,82	3,39	2,99
Pb (ppm)	5,66	7,41	11,12	12,48	8,58
Ca (ppm)	715,16	566,37	843,05	925,55	823,05
Cu (ppm)	3,32	2,26	1,865	2,16	2,09
Fe (ppm)	103,75	52,21	75,13	94,38	56,39
K (ppm)	20,6	1,11	22,05	27,77	20,08
Mg (ppm)	318,06	75,63	365,33	449,79	267,63
Mn (ppm)	24,81	2,79	21,2	28,67	23,39
Na (ppm)	11,29	11,105	6,94	12,54	9,67
Zn (ppm)	14,29	10,75	14,25	13,3	11,85

Cadmio (Cd); Cromo (Cr); Chumbro (Pb); Cálcio (Ca); Cobre (Cu); Ferro (Fe); Potássio (K), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Sódio (Na), Zinco (Zn);

Os lons inorgânicos que estão presentes em hidrolisados lignocelulósicos originamse da biomassa lignocelulósica, de produtos químicos adicionados durante pré-tratamento, do acondicionamento e hidrólise propriamente dita e, possivelmente, a partir de equipamentos do processo. Em concentrações moderadas, existe uma possibilidade de que os íons inorgânicos aumentem a produção de etanol (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

De uma maneira geral, o bagaço "in natura" apresentou uma maior concentração de cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, sódio e zinco em relação ao bagaço após a hidrólise ácida. A principal diferença pode ser notada para o potássio, com uma redução de 98% do bagaço tratado em relação ao bagaço "in natura". Já o manganês e o magnésio apresentaram uma redução de 88 e 76%, respectivamente, em relação ao hidrolisado após hidrólise ácida. Variação na concentração de um mesmo íon foram observadas para caule de sorgo (24,8-32,8 ppm de ferro, 1,74-1,91 ppm de cobre, 9,36-11,40 ppm de zinco; 8,9-14,1 ppm manganês) em função da cultivar e data do plantio (SINGH et al., 2012).

O cádmio, chumbo e o cromo, ao contrário, aumentaram com o tratamento de hidrólise ácida em relação ao bagaço "in natura" em 77; 30 e 10%, respectivamente. O cádmio, chumbo, cromo e cobre são denominados metais pesados, pois apresentam peso molecular maior que 60 e densidade superior a 4 g/cm<sup>3</sup>. Os metais pesados como cobre, níquel, zinco, cádmio, cromo e chumbo têm sido relatados como inibitórios e sob certas condições podem ser tóxicos em reações bioquímicas, dependendo das suas concentrações (MUDHOO, KUMAR, 2013). A inibição de biomassa heterotrófica por metais pesados seguiu a ordem Cu<sup>(+2)</sup>>Pb<sup>(+2)</sup>>Zn<sup>(+2)</sup>>Ni<sup>(+2)</sup>, sendo o Cu<sup>(+2</sup> o metal mais tóxico, causando alta inibição da biomassa heterotrófica, mesmo a baixas concentrações (10 mg/L) (MALAMIS et al., 2012). Concentrações entre 0,09-6,5; 0,18; 0,07-2,45 e 9,63-34,74 ppm de cobre, cádmio, chumbo e zinco, respectivamente, foram encontradas para bagaço de diferentes cultivares de cana-de-açúcar (XIE et al., 2014).

No presente trabalho, a concentração de metais aumentou para todos os íons avaliados no hidrolisado concentrado em relação ao hidrolisado "in natura". Os principais aumentos foram observados para cromo e sódio em 86 e 80%, respectivamente, em relação ao hidrolisado "in natura". Esse aumento provavelmente foi devido à retirada de água durante o processo de concentração a vácuo.

Já no hidrolisado destoxificado houve redução de todos os íons em relação ao hidrolisado concentrado, o que já era esperado, visto que o tratamento com carvão ativo, além de adsorver os compostos tóxicos, também deve ter adsorvido os compostos minerais. O efeito mais acentuado foi observado para o ferro, magnésio e cádmio, com redução de cerca de 40%. Além disso, a alteração de pH pode ter precipitado os íons presentes, pois, a concentração de íons metálicos em solução depende do pH, uma vez que este parâmetro também controla a dissolução/precipitação de metais na forma de óxidos-hidróxidos, carbonatos, fosfatos, etc (PUGAS, 2007).

Muitos desses íons encontrados neste estudo, quando presentes no hidrolisado hemicelulósico, podem influenciar positivamente a produção de etanol, pois a maioria dos hidrolisados utilizados em processos fermentativos requerem adição de elementos traços, tais como CuSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, MnSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> e CoCl<sub>2</sub>, a fim de não limitarem o crescimento, visto que muitos desses nutrientes são essenciais ao metabolismo dos microrganismos (NIGAM, 2001; STOUTENBURG et al., 2008).

Redução nas concentrações de íons metálicos de magnésio (5,78%), cálcio (20%), ferro (93,4%) e potássio (99,9%) foram observados no hidrolisado hemicelulósico de casca de aveia tratados em relação ao hidrolisado original com a mesma metodologia utilizada neste trabalho, enquanto que as concentrações de sódio e níquel foram aumentadas. Segundo os autores, isto ocorreu provavelmente devido ao uso de NaOH para ajustar o pH dos hidrolisados antes da sua utilização como meio de fermentação. Além disso, o aumento da concentração também pode estar relacionado ao equipamento usado para a homogeneização do hidrolisado durante o processo de tratamento e o ajustamento do pH (CHAUD et al., 2012).

Quando *S. stipitis* foi cultivada em baixos níveis de Mg<sup>+2</sup>(1 mM) e quantidade limitada de oxigênio, o fluxo de carbono a partir de xilose foi dirigido para a produção de xilitol, diminuindo o rendimento de etanol. Nesse sentido, os autores indicam que alta concentração de Mg<sup>+2</sup> deve ser empregada para produção de etanol, enquanto que baixos níveis de Mg<sup>+2</sup> são recomendados para produção de xilitol (MAHLER; GUEBEL, 1994).

Em trabalho para produção de etanol e arabitol por *Debaryomyces nepalensis* foi verificado que o organismo requer zinco, ferro, cobre e manganês para o crescimento, bem como a formação de produto. Segundo os autores, os elementos tais como o zinco, manganês, cobre, ferro estão envolvidos no metabolismo de levedura como co-fatores para

as enzimas e como componentes das vias respiratórias. Assim, na ausência desses elementos o metabolismo é prejudicado (KUMDAM; MURTHY; GUMMADI, 2013).

Em relação ao hidrolisado de bagaço de cana não destoxificado, o hidrolisado hemicelulósico tratado com resina de troca iônica promoveu uma remoção de 82,1% furfural, 66,5% de HMF, 100% de cromo, 46,1% de zinco, 28,5% de ferro, 14,7% de sódio e 3,5% de níquel (CARVALHO et al., 2004).

As influências de Cu<sup>+2</sup>, Al<sup>+3</sup>, Ni<sup>+2</sup>e Co<sup>+2</sup> foram avaliadas no crescimento e na produção de etanol por *S. stipitis* ATCC 58784. Os resultados demonstraram que baixa concentração de Cu<sup>+2</sup> e Al<sup>+3</sup> (<0,24 mM e <0,23 mM, respectivamente) melhoraram o crescimento da biomassa em 34 e 13%, respectivamente. No entanto, concentrações mais elevadas tiveram efeito oposto (LI et al., 2009).

# 5.6 Produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico destoxificado do bagaço de sorgo por *S. stipitis*

## 5.6.1 Crescimento celular

Na Figura 26 pode-se observar o crescimento celular da levedura *S. stipitis* ao longo de 76 horas no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo sacarino, obtido por hidrólise ácida com 1,75% de ácido sulfúrico por 40 minutos a 121 °C, concentrado a vácuo e tratado com alteração de pH e adsorção com carvão ativo. Conforme apresentado no gráfico, pode ser observado que nas primeiras 10 horas não houve um crescimento celular acentuado. Isso provavelmente se deu em razão do hidrolisado hemicelulósico apresentar composição química diferente do meio sintético utilizado para o cultivo inóculo. Com isso, os microrganismos não se reproduzem imediatamente ao serem inoculados, precisando de um período de adaptação ao novo meio de cultura. Essa fase de adaptação é conhecida por ser muito importante aos microrganismos, pois estes estão com alta atividade metabólica, principalmente com síntese de proteínas e enzimas, que são requeridas em fases posteriores, como durante a fase de divisão, auxiliando assim no crescimento celular.

A partir das 8 até as 48 horas, houve intensa divisão celular, alcançando 12 g/L de biomassa, ou seja, após o período inicial de adaptação as leveduras começaram a se multiplicar de forma mais acelerada, devido à grande disponibilidade de açúcar. A partir das 48 até 60 horas não houve grande aumento na quantidade de biomassa microbiana. Com isso, percebe-se que a velocidade de crescimento diminuiu, entrando no período conhecido como fase estacionária. Esse resultado provavelmente se deu em razão da quantidade de nutrientes que se tornou limitada, ou ainda pelo acúmulo de produtos da degradação no meio de cultura. Esse período é conhecido pelo número de células novas ser próximo à quantidade de células mortas, sendo que a população se torna estável. Ainda, nessa fase a atividade metabólica de cada célula também decresce.



Figura 26 Crescimento celular durante a fermentação com *S. stipitis* ATCC 58376 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo sacarino.

Os resultados obtidos neste trabalho para o crescimento celular são superiores aos encontrados por Chaud et al. (2012), que utilizaram esta mesma levedura cultivada em hidrolisado hemicelulósico de casca de aveia (40 g/L de xilose) e observaram um crescimento inferior a 6 g/L com 72 horas de fermentação. Em hidrolisado hemicelulósico de sorgo forrageiro, é relatada uma produção de biomassa de *Candida guilliermondi* entre 8 e 11 g/L, conforme a variedade de biomassa empregada no processo, ao final da fermentação (72 horas) (CAMARGO et al., 2015). Um crescimento celular de 7 g/L foi observado ao final de 73 horas de fermentação por *C. guilliermondi* em hidrolisado hemicelulósico de palha de sorgo a partir da concentração inicial de xilose de 43,78 g/L (SENE et al., 2011). Silva et al. (2011), ao estudarem a produção de etanol por *S. stipitis* num biorreator de tanque agitado usando meio contendo xilose (90,0 g/L) como a fonte de carbono principal, obtiveram concentração final de células entre 11 e 17 g/L, em decorrência da variação de kLa utilizada no estudo, que variou entre 0,7 e 12,1 h<sup>-1</sup>.

## 5.6.2 Variação de concentração de açúcares e produção de etanol

A Figura 27 exibe o consumo de glicose e xilose no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo por *S. stipitis*. Pode-se observar que a glicose presente no hidrolisado hemicelulósico em concentração menor que 5 g/L foi consumida nas primeiras 12 horas de fermentação. Outros autores também observaram que a glicose é utilizada por leveduras nas primeiras 12 horas durante processos fermentativos, empregando hidrolisados hemicelulósicos, sendo que é utilizada para manter o crescimento celular nas primeiras horas de fermentação, quando a assimilação da xilose é ainda lenta (SILVA et al., 2011; SENE et al., 2011; SILVA et al., 2014). Além disso, estudos ainda sugerem que quando a

glicose e a xilose estão presentes no mesmo meio, a xilose só passa a ser consumida por *S. stipitis* após o esgotamento de toda a hexose, ou seja, a glicose exerce repressão catabólica no consumo de xilose (LEE et al., 2000; GROOTJEN; VAN DER LAN; LUYBEN, 1991).



Figura 27 Consumo de xilose ( $\checkmark$ ) e glicose ( $\bullet$ ) durante a fermentação com *Scheffersomyces stipitis* ATCC 58376 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo sacarino.

A xilose, por sua vez, foi consumida ao longo do processo fermentativo, inclusive concomitantemente à glicose. A partir das 55 horas de fermentação, uma concentração dessa pentose menor que 2 g/L estava presente no meio de cultivo. Ao final das 76 horas, foi observado que 99% de toda essa pentose havia sido utilizado pela levedura durante a fermentação. O consumo de açúcares simultâneo é um aspecto importante a ser considerado, uma vez que a inibição do transporte de xilose para a célula pela glicose seria uma desvantagem significativa para o processo.

Com relação à arabinose (dados não mostrados) foi verificado que não houve consumo da mesma durante o processo fermentativo estudado, mantendo-se constante (1,6 g/L) durante todo o período analisado. Este resultado está de acordo com o relatado em outros trabalhos, nos quais também não foi observada a assimilação da arabinose durante processo fermentativo por *S. stipitis* (CHAUD et al., 2012; SILVA et al., 2014). A mínima presença de glicose ou xilose é conhecida por reprimir totalmente o consumo de arabinose por *C. guilliermondii*, e essa pentose só passa a ser consumida quando é a única fonte de carbono presente no meio (MUSSATTO; SILVA; ROBERTO, 2006).

A produção de biomassa e o consumo de açúcar por *S. stipitis* são favorecidos em meio contendo glicose, pois esse substrato é canalizado para a produção de biomassa, já em meios de cultura com maior concentração xilose, o substrato é direcionado para produção de etanol, resultando em melhores rendimentos deste. Além disso, as atividades específicas de xilose redutase e xilitol desidrogenase são superiores no meio com xilose do

que com glicose, sugerindo a sua indução pela xilose (LEE et al., 2000; AGBOGBO et al., 2006).

A S. stipitis pode produzir até 41 g de etanol/L e apresentam as principais vantagens de necessidade nutricional menos rigorosa, grande resistência à contaminação e paredes celulares espessas, fazendo com que seja um organismo viável para aumento de escala. No entanto, *S. stipitis* tem uma taxa de consumo de açúcar mais lento em comparação com *Saccharomyces cerevisiae* e requer condição microaerófila para produção de etanol (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

Segundo estudos de Aloisio et al. (2014), a *S. stipitis* é capaz de converter a glicose, xilose e mistura de glicose/xilose em etanol; porém, em meio com glicose esse microrganismo não apresenta fase lag, enquanto que na presença de xilose os autores verificaram que a fase lag dura de 4-5 horas.

Em processo fermentativo para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol empregando a mesma cepa deste trabalho, foi verificado que o aumento da agitação de 100 para 200 rpm acelerou o consumo total de glicose (20 g/L) de 48 para 24 horas. Nessa mesma pesquisa, também foi verificado que o consumo de xilose total (24,98 g/L) presente no meio ao final de 72 horas de fermentação foi próximo ao obtido neste trabalho (92-96%) (CAMARGO; SENE, 2014).

Em estudo com o objetivo de avaliar a adaptação das células de *S. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana não-destoxificado para produção de etanol, foi verificado que as células adaptadas consumiram em torno 95% de xilose, enquanto que na fermentação empregando inóculo não adaptado o consumo de xilose foi de apenas 50,78%. Segundo os autores, este tipo de comportamento pode estar relacionado com a tolerância das células após adaptação ao hidrolisado e a redução dos efeitos tóxicos devido a sua absorção e transformação em compostos menos tóxicos (SILVA et al., 2014).

Como já descrito, a presença de compostos tóxicos são conhecidos por inibirem o consumo de açúcares e afetarem o crescimento dos microrganismos, porém os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as concentrações de ácido acético, furfural, HMF e fenólicos presentes estavam em quantidades que não trouxeram prejuizos ao metabolismo microbiano, demonstrando que o pré-tratamento empregado foi efetivo sobre a remoção dos compostos inibitórios a nível que não apresentou efeito sobre o cultivo celular.

A Figura 28 demonstra a produção de etanol ao longo das 76 horas de fermentação no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo sacarino pela levedura *S. stipitis*. A partir dos resultados, é verificado que a produção de etanol começou com 4 horas de fermentação, sendo intensificada a partir da 10<sup>a</sup> hora. A maior concentração de etanol (22 g/L) no meio foi observada com 55 horas e, a partir desse período, foi então verificado redução da concentração do mesmo, sendo que ao final das 76 horas a concentração final de etanol foi de 18 g/L.



Figura 28 Produção de etanol durante a fermentação com *Schefferosomyces stipitis* ATCC 58376 em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

Estes resultados de produção de etanol estão relacionados à presença de açúcares no meio, conforme demonstrado na Figura 27. No começo do processo, quando a glicose e a xilose estavam amplamente disponíveis, esses carboidratos foram utilizados para geração de energia pelo microrganismo estudado e produção de etanol como metabólito. Porém, com o esgotamento dos açúcares ao longo do processo fermentativo, as células passaram a utilizar o etanol formado a partir do catabolismo da glicose.

Esses resultados, quando confrontados com a Figura 26, que demonstram o crescimento celular, permitem notar a influência do consumo de açúcar sobre formação de biomassa e de etanol, pois a partir das 55 horas foi observado que as células diminuíram o número de divisões e entraram na fase estacionária. Porém, com o uso do etanol como fonte de carbono, as células retomaram o crescimento a partir das 60 h, embora de maneira mais branda. O comportamento similar de consumo de etanol também já foi observado por outros autores para esta mesma levedura (FERREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2012; STOUTENBURG et al., 2008; FU et al., 2009).

Ferreira et al. (2011), ao avaliarem a capacidade da estirpe de *S. stipitis* recentemente isolada (UFMG-IMH 43.2) na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana com concentração inicial de 30 g/L de xilose, observaram uma produção máxima de etanol de 4 g/L em 48 horas, seguida da redução da concentração após este tempo. De acordo com os autores, essa redução é devido ao seu consumo pela levedura, como uma consequência do esgotamento rápido de açúcares no meio, assim como observado neste trabalho.

Silva et al. (2012), avaliando o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na produção de etanol a partir de xilose por *S. stipitis*, observaram que para um kLa 18,7 h<sup>-1</sup> a produção máxima de etanol (13,5 g/L) ocorreu com 36 h de fermentação e, depois, parte do etanol produzido foi assimilada pelas células, embora a xilose estivesse disponível em

grande parte (40 g/L) no meio. Segundo os autores, nesse caso, a assimilação do etanol pela levedura sugere que o oxigênio foi fornecido em excesso neste meio, devido à disponibilidade elevada da taxa de oxigênio.

Segundo Skoog et al. (1992), durante a reassimilação, o etanol é oxidado primeiro para o acetaldeído e depois a acetato. Estes componentes podem ser acumulados de forma intracelular, excretados, ou ainda oxidados através do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, e tanto a reassimilação do etanol quanto a formação do acetato estão ligados ao desequilíbrio redox que pode então inibir a descarboxilação no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos.

A disponibilidade de oxigênio para o meio é essencial para garantir a elevada produção de etanol por *S. stipitis*, mas esta variável deve ser cuidadosamente controlada, uma vez que o excesso de oxigênio afeta o metabolismo de carbono, favorecendo o crescimento celular e sendo prejudicial para a formação de etanol. Nesse sentido, o uso de transferência de oxigênio adequada durante a fermentação é fundamental para o crescimento das células e a produção de etanol de maneira eficiente (SILVA et al., 2012). Ou seja, a produção de etanol por *S. stipitis* é fortemente afetada pelo estado de oxidoredução intracelular. Portanto, a produção de etanol ocorre sob condição relativamente baixa de oxigênio, enquanto que o etanol pode ser reassimilado quando a taxa de oxigênio é excessiva (LIU et al., 2012).

Neste trabalho, como foi empregada uma taxa de oxigênio (kLa 4,9 h<sup>-1</sup>) já otimizada em outro trabalho (SILVA et al., 2011), mantida a condição microaerófila, ou seja, baixo nível de oxigênio (0,05 L de ar/minuto) e em nenhum momento foi aumentado o fluxo de ar, a produção de etanol se iniciou logo nas primeiras horas de fermentação e o consumo de etanol provavelmente ocorreu devido à condição de esgotamento dos açúcares, tendo então a reassimilação de etanol ocorrido para suprir a fonte de carbono.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram relatados por Silva et al. (2012) para crescimento celular (15 g/L), produção de etanol (26 g/L) e consumo de açúcares (glicose e xilose 96%) pela levedura *S. stipitis* em meio sintético (90 g/L de xilose e 15 g/L de glicose) em biorreator com um kLa de 4,9 h<sup>-1</sup> em 96 horas de fermentação.

Ao avaliar a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico da madeira de eucalipto usando *S. stipitis* NRRL Y-7124, Ferrarini et al. (1992) obtiveram concentração máxima de etanol 12,6 g/L em 75 horas de fermentação, a partir de 30 g/L de xilose, 2,8 g/L de arabinose e 1,5 g/L glicose.

Em estudo de Dubey et al. (2015), que avaliaram a cepa da levedura de *S. stipitis* NCIM 3499 na utilização de xilose ou glicose para produção de etanol, os autores verificaram que a levedura metabolizou xilose (32 h) mais rápido que glicose (40 h) e com menor concentração de açúcares residuais (7,43 g/L de glicose e 1,59 g/L de xilose). A mesma levedura também produziu teor máximo de etanol de 3,97 g/L e 7,94 g/L após 40 h de fermentação a partir da glicose e xilose, respectivamente, em meio de cultura sintético

inoculado com concentração celular de 5% (v/v) e fermentação realizada a 30 °C, 150 rpm com concentração inicial de 20 g/L de xilose ou glicose.

Na Tabela 10 estão demonstrados os parâmetros fermentativos obtidos neste trabalho durante a fermentação de *S. stipitis* ATCC 58376 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo sacarino. Também estão apresentados alguns parâmetros fermentativos obtidos a partir da literatura.

Microrganismo	Hidrolisado	Y <sub>p/s</sub> (g/g)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	Q <sub>P</sub> (g/L.h <sup>-1</sup> )	Referencia
S. stipitis ATCC 58376	Bagaço de Sorgo sacarino	0,40	0,28	0,34	Este estudo
S. stipitis ATCC 58376	Farelo de girassol	0,23	0,12	0,12	Camargo, Sene, 2014
S. stipitis DSM 3651	Bagaço de cana	0,30	0,37	0,16	Canilha et al., 2010
S. stipitis NRRL Y-7124	Palha de arroz	0,31	0,16	0,32	Silva, Carneiro, Roberto, 2014
S. stipitis NRRL 7154	Palha de trigo	0,41	-	0,54	Nigam (2001)
S. stipitis NCIM3499	Farelo de arroz	0,42	0,21	0,17	Chandel et al. (2009)
S. stipitis NRRL 7124	Bagaço de cana	0,34	0,16	0,20	Cadete et al. (2012)
S. stipitis CBS 6054	Cana-do-reino	0,33	0,11	0,52	Scordia et al. (2012)
S. stipitis NRRL 7124	Palha de arroz	0,37	0,12	0,39	Silva, Mussatto, Roberto (2010)
S. stipitis NRRL Y-7124	Bagaço de cana	0,22	0,12	0,12	Milessi et al. (2013)

Tabela 10 Parâmetros fermentativos obtidos durante a fermentação com *S. stipitis* ATCC 58376 em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino e valores obtidos da literatura

 $Y_{x/s}$ : Fator de conversão de substrato em células (g/g);  $Y_{p/s}$ : Fator de conversão de substrato em produto (g/g);  $Q_P$ : Produtividade volumétrica do produto (ex: g/L.h<sup>-1</sup>).

Com os resultados pode-se perceber que foram obtidos alta produtividade e rendimento de etanol. Ainda é possível perceber que o rendimento em células também foi considerado elevado. Porém, a consequência de ter uma maior quantidade de células é importante para a formação de etanol, visto que o mesmo é um produto do metabolismo. Esse processo teve uma eficiência de fermentação de 75%, indicando alta quantidade de etanol formada durante o processo, visto que o rendimento máximo não pode ser alcançado, pois parte do substrato é desviado para o crescimento e a manutenção das células e a para formação de subprodutos do metabolismo.

Os valores de Y<sub>p/s</sub> e Q<sub>p</sub> obtidos neste estudo são comparáveis ou mesmo melhores do que os parâmetros fermentativos encontrados na bibliografia para produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de diferentes matérias-primas. Por exemplo, a produção

de etanol pela mesma levedura utilizada neste estudo levou a um rendimento máximo  $Y_{p/s}$  de 0,23 g/g e  $Q_P$  0,12 g/L.h<sup>-1</sup> durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol (CAMARGO; SENE, 2014). A produção de etanol por fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, utilizando *S. stipitis* DSM 3651, resultou em valores inferiores de  $Y_{p/s}$  (0,30 g/g) e  $Q_P$  (0,16 g/L.h<sup>-1</sup>), respectivamente (CANILHA et al., 2010). A fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo por *S. stipitis* NRRL 7154 rendeu  $Y_{p/s}$  de 0,41 g/g e  $Q_P$  de 0,54 g/L.h<sup>-1</sup> (NIGAM, 2001).

Os resultados obtidos nesse trabalho ainda se assemelham aos obtidos por Rouhollah et al. (2007) durante bioconversão em etanol a partir de meio sintético com 60 g/L de açúcares (30 g/L de xilose e 30 g/L de glicose) por *S. stipitis* CCUG18492 no qual obtiveram uma quantidade máxima de 30 g/L de etanol com rendimento de etanol e células de 0,40 g/g e 0,08 g/g, respectivamente, produtividade de 0,95 g/L<sup>-1</sup> e eficiência de 94%.

Valores próximos aos relatados neste trabalho foram obtidos por Bellido et al. (2013), ao estudarem a influência de diferentes taxas de aeração (9,6 h<sup>-1</sup>: 0,50 L de ar/minuto; 5,9 h<sup>-1</sup>: 0,25 L de ar/minuto; 3,3 h<sup>-1</sup>: 0,10 L de ar/min e 1,1 h<sup>-1</sup>: 0,03 L de ar/minuto) sobre a produção de etanol por *S. stipitis* DSM 3651. Os autores obtiveram 22,33 g/L de etanol com  $Y_{p/s}$  de 0,40 g/g e  $Q_P$  de 0,30 g/L.h<sup>-1</sup> em 72 horas de fermentação empregando um kLa 3,3 h<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados em biorreator a 30 °C, 175 rpm, pH 5, com meio sintético composto de 35 g/L de glicose e 20 g/L de xilose.

Dussán et al. (2016), ao avaliarem a influência da aeração, a taxa de agitação e o pH inicial na produção de etanol por *S. stipitis* NRRL Y-7124 a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, obtiveram melhores resultados: rendimento de 0,42 g/g, produtividade de 0,25 g/L.h<sup>-1</sup> e eficiência de 85%, empregando 100 rpm, pH inicial 6,50 e sob condições limitadas de oxigênio (0.7 vvm, kLa de 0,1 h<sup>-1</sup>). Esses experimentos foram realizados em biorreator operado a 30 °C por 72 h.

# 5.6.3 Variação do pH da concentração de ácido acético e produção de xilitol

Na Figura 29 está demonstrada a variação de ácido acético, pH e a produção de xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo por *S. stipitis*. Verifica-se que o ácido acético diminuiu ao longo do processo fermentativo, sendo que a partir das 30<sup>a</sup> hora esse decréscimo foi mais acentuado. Ao final da fermentação, uma concentração menor que 0,2 g/L estava presente, indicando uma assimilação de 88% e uma possível utilização desse composto orgânico como fonte de carbono para o metabolismo microbiano.

Esse consumo de ácido acético já foi observado em outros trabalhos, como por Sene et al. (2011) durante a produção de xilitol com *C. guilliermondi* em hidrolisado hemicelulósico de palha de sorgo com composição de glicose 4.30 g/L; xilose 43,78 g/L; arabinose 4,32 g/L;

ácido acético 3,13 g/L; furfural 0,05 g/L; HMF 1,52 g/L e fenólicos 1,36 g/L na qual cerca de 28% de ácido acético foi assimilado dentro de até 72 horas.



Figura 29 Variação de ácido acético (a) e pH (b) e produção de xilitol (c) durante a fermentação com *S. stipitis* ATCC 58376 em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

A utilização de ácido acético (mais de 70%) foi também verificada por *C. guilliermondi* FTI 20037 e *S. stipitis* NRRL Y-7124 em fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (pré-tratado a 121 °C, 20 min, 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) com 45.0 g/L de xilose, 1.0 g/L de glicose; 3.5 g/L de arabinose, 2.5 g/L de ácido acético, 0.0037 g/L de furfural e 0.69 g/L de compostos fenólicos. Segundo os autores, é possível que o ácido acético tenha sido usado para o crescimento celular, enquanto a xilose poderia ter sido utilizada para a formação de xilitol e etanol em *C. guilliermondi* e *S. stipitis*, respectivamente (SILVA et al., 2014).

O efeito da concentração de ácido acético sobre a fermentação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 foi avaliado em meio semi sintético e os autores verificaram que o aumento da concentração de ácido acético até 1,0 g/L favoreceu o rendimento (0,82 g/g) e a produtividade (0,57 g/L.h<sup>-1</sup>). De acordo com os autores, o ácido acético foi assimilado pela levedura, juntamente com os açúcares, sugerindo que estas células atuam como agentes de desintoxicação do meio de cultura (FELIPE et al., 1995).

Com relação à variação do pH observada neste trabalho, é possível verificar que houve uma pequena redução ao longo do processo, provavelmente pela excreção de outros metabólitos não avaliados neste trabalho de caráter ácido ou ainda pela formação de produtos e subprodutos. É importante ressaltar que existem outros ácidos presentes em

hidrolisados hemicelulósicos, a citar o ácido fórmico e furfurílico, os quais não foram analisados no presente trabalho e podem ter contribuído para a manutenção do pH (DALANHOL, 2014). Uma redução do pH de 5,7 para 5,3 também foi observada em hidrolisado hemicelulósico de sorgo forrageiro após 96 horas de fermentação por *C. guilliermondii* FTI 20037 (CAMARGO et al., 2015).

Uma diminuição da concentração de ácido acético de 50% também foi observada por Chaud et al. (2012) quando o hidrolisado hemicelulósico de casca de aveia pré-tratado a 156 °C, 27 min com 0.35% m/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e destoxificado com mesma metodologia empregada neste trabalho foi utilizado como meio de fermentação para *S. stipitis* NRRL Y-7124, porém os autores, diferentemente deste trabalho, observaram o aumento do pH do meio.

Com relação ao xilitol, é possível observar através do gráfico que a produção se deu a partir da 15<sup>a</sup> hora, sendo posterior ao consumo total de glicose, e, ao final da fermentação, uma concentração de 0,6 g/L havia sido produzida. A formação de xilitol e seu acúmulo durante a fermentação são considerados como uma resposta celular às adversidades do meio, seja pelo desequilíbrio redox, que pode ser causado sob restrições de oxigênio, concentração do substrato elevada, ou a presença de inibidores que podem ser gerados durante a fase de pré-tratamento, especialmente se são impostas condições de alta severidade (BETANCUR; PEREIRA JR, 2010).

Lee et al. (2000), ao avaliarem várias concentrações iniciais de xilose (30; 50; 90; 130 e 170 g/L) no processo fermentativo de *S. stipitis* Y-7124, observaram o aumento da concentração de xilitol conforme o aumento da concentração da pentose no meio de fermentação, sendo que a 30 g/L não foi verificada formação desse subproduto. Além disso, os autores relataram uma quantidade similar de xilitol (0,81 g/L) ao observado neste trabalho quando empregaram concentração inicial de xilose de 50 g/L e realizaram a fermentação a 30 °C e pH 5. Nesta mesma condição, os autores observaram uma produção de biomassa de 7 g/L e 17,7 g/L de etanol

Concentrações superiores de xilitol (1,48 g/L) foram obtidas durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol (20,66 g/L glicose, 24,09 g/L xilose, 6,51 g/L arabinose, 3,04 g/L e 0,58 g/L de ácido acético) na produção de etanol pela mesma levedura empregada neste estudo (CAMARGO; SENE, 2014).

Grande parte da xilose metabolizada é convertida a xilitol, que é o principal coproduto formado nos cultivos de xilose sob condições limitadas de oxigênio, comprometendo, assim, a produção de etanol, sendo que resulta do desequilíbrio redox entre os co-fatores das enzimas xilose-redutase e xilitol desidrogenase, o qual ocorre sob condições limitadas de oxigênio, necessárias para que o substrato seja convertido em etanol e não a biomassa (HICKERT, 2010).

O metabolismo de xilose em leveduras e fungos filamentosos prossegue através de uma reação em dois passos, em que primeiro a xilose é reduzida em xilitol pela xilose redutase dependente de NADPH, seguido por oxidação do xilitol em xilulose por uma desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup>. Sob condições anaeróbicas, haverá um excesso de NADH, resultando num desequilíbrio redox, que bloqueia a atividade metabólica, uma vez que não pode ser re-oxidado na ausência de oxigênio. No entanto, em leveduras fermentadoras de xilose, tais como células de *S. stipitis*, estas duas primeiras enzimas apresentam dupla especificidade pelos cofatores. Assim, os equivalentes de redução produzidos na segunda reação podem ser usados para o passo inicial do metabolismo de xilose, por conseguinte, reduz o excesso de produção de NADH e, consequentemente, aliviando o desequilíbrio redox celular (SILVA et al., 2011).

# 5.7 Produção de etanol a partir da fração celulósica do bagaço de sorgo

# 5.7.1 Avaliação do processo de deslignificação da porção sólida do bagaço de sorgo sacarino

Para melhorar a eficiência enzimática, a celulignina residual do bagaço de sorgo proveniente da melhor condição de hidrólise ácida (1,75% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40 minutos e 121 °C), após lavagem e caracterização da porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina, seguiu para estudo da avaliação do processo de deslignificação com variação na concentração da solução de NaOH (1; 2,5 e 4%) e tempo de deslignificação (20, 40 e 60 min). Os resultados da caracterização quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa, após o processo de deslignificação no tempo e concentração da base, podem ser conferidos na Figura 30.

Como pode ser verificado, o tratamento que resultou na maior deslignificação foi o que empregou tempo de 60 minutos e 4% de NaOH, removendo 70% da lignina presente na celulignina. De maneira semelhante, o tratamento com 2,5% de NaOH e 60 minutos apresentou uma remoção de 68% da lignina presente na biomassa. Nesse caso, remoção semelhante e com porcentagem de reagente menor adicionada representa uma redução de custo interessante ao longo do processo. Também pode-se perceber que o tempo foi um fator importante para o processo de deslignificação, sendo que o aumento de tempo associado à concentração de NaOH adicionada promove a maior remoção de lignina na biomassa.

Durante o processo de deslignificação estudado, não foram percebidas perdas acentuadas de celulose. Após o processo de deslignificação para todos os tratamentos, a quantidade desse polissacarídeo era superior a 80%, ou seja, a biomassa era composta basicamente por celulose. Assim, a mesma se torna uma boa opção para ser utilizada como fonte de hexose após a hidrólise enzimática que romperá as ligações dos polissacarídeos e liberará os monômeros de glicose.



Figura 30 Análise de celulose, hemicelulose e lignina na biomassa sólida residual de bagaço após estudo da deslignificação com variação na concentração de NaOH e tempo de autoclave.

O processo de deslignificação ainda contribuiu para remoção da porção hemicelulósica residual presente na biomassa após hidrólise ácida, removendo cerca de 30% do conteúdo desse polissacarídeo após o pré-tratamento com NaOH.

De acordo com a literatura, a lignina é um fator limitante para hidrólise enzimática de celulose, e o processo de deslignificação resulta em maior rendimento na produção de bioetanol (SANTOS; GOUVEIA, 2009; HAN et al., 2012).

Durante o pré-tratamento na presença de um agente alcalino, ocorrem as seguintes funções: (i) inchamento de celulose; (ii) condução a um aumento da área de superfície interna; (III) diminuição do grau de polimerização da celulose e cristalinidade; (iv) levando à solvatação parcial de hemicelulose; (v) destruição das ligações estruturais entre lignina e carboidratos por saponificação de ligações éster intermoleculares; e (vi) rompimento da estrutura da lignina, quebrando a sua ligação glicosídica éter. A lignina deixará de agir como escudo de proteção para a celulose, após o passo de solubilização, tornando assim a celulose mais suscetível a extração (LEE; HAMID; ZAIN, 2014).

Assim como o observado neste trabalho para o bagaço de sorgo sacarino, a deslignificação de gramíneas apresentou uma remoção maior que 70% quando utilizada concentrações superiores a 3% NaOH e tempos de deslignificação maiores que 39 minutos realizados a 121 °C (WANG et al., 2010). Após a hidrólise ácida da palha de sorgo (5%; 120 °C; 30 minutos) seguida da deslignificação (5%; 120 °C; 30 minutos), foi observada grande alteração na estrutura morfológica da biomassa, com a remoção da porção externa da lignina e exposição da fibra de celulose. Portanto, durante o pré-tratamento ocorre o aumento da superfície, tornando as fibras mais vulneráveis ao ataque enzimático (CARDOSO et al., 2013). Em estudo realizado por Goshadrou, Karimi e, Taherzadeh (2011),

no qual o bagaço de sorgo foi deixado por 3 horas em solução de NaOH (12% m/v) para deslignificação. Os autores verificaram que a lignina foi reduzida de 16,47% para 11,50%.

Han et al. (2012) estudaram a eficácia dos pré-tratamentos de deslignificação com variação na concentração de hidróxido de sódio (0,25-1,5% m/v) e tempo (0,5-2,5 horas) a 121 °C para a conversão enzimática da palha de trigo. Os autores observaram que o pré-tratamento com 1% hidróxido de sódio e 1,5 h resultou no teor de celulose de palha de trigo de 44,52%, enquanto que o teor de hemicelulose e lignina foi reduzido em 44,15% e 42,52%, respectivamente.

Para palha de trigo, após o pré-tratamento com 1,0% de NaOH (121 °C) durante 1,5 h, a percentagem de celulose, hemicelulose e lignina foi de 57,33%, 14,33% e 11,7%, respectivamente. O teor de celulose aumentou em 44,52%, enquanto que o teor de hemicelulose e lignina foi reduzido em 44,15% e 42,45%, respectivamente (HAN et al., 2012). Li et al. (2013) observaram uma remoção de 70% de lignina do bagaço de sorgo deslignificado com concentração de 3,33 mmol/g de biomassa seca de NaOH a 140 °C.

Os resultados apresentados para deslignificação do bagaço de sorgo sacarino neste trabalho como estratégia para tornar a celulose mais amplamente disponível indicam o tratamento com 2,5% de NaOH, o qual removeu grande parte da lignina (44, 55 e 69% com 20, 40 e 60 minutos, respectivamente) com menor concentração de NaOH utilizado.

# 5.7.2 Avaliação da hidrólise enzimática

A biomassa de bagaço de sorgo sacarino após ter passado pela hidrólise ácida com 1,75 m/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 121 °C por 40 minutos e deslignificada com 2,5% de NaOH por 60 minutos, foi submetida ao estudo da avaliação da hidrólise enzimática com variação na concentração das cargas enzimáticas e na temperatura. As temperaturas avaliadas foram 38, 41 e 44 °C, e em cada temperatura foram empregados três diferentes níveis da enzima celulase NS22086 (15; 20 e 25 FPU de celulase por grama de bagaço), sendo que cada nível recebeu a adição de dois subníveis de  $\beta$ -glicosidase NS22118 (CBU/g), na proporção de 1:3 ou 2:3 em relação à celulase. Os resultados dos perfis da hidrólise enzimática do bagaço de sorgo para as diferentes temperaturas e cargas enzimáticas se encontram dispostos na Figura 31.

Nesse, sentido, considerando que o custo das enzimas para a hidrólise em um processo de produção de etanol celulósico é um dos fatores que mais encarece o processo, ressalta-se a importância de estudos sobre o efeito da celulase nas diferentes biomassas, a fim de que sejam encontradas concentrações de enzimas que promovam a máxima conversão enzimática da celulose em glicose e com menores dosagens enzimáticas, de forma que esse processo seja mais econômico.



Figura 31 Perfis cinéticos da hidrólise enzimática do bagaço de sorgo sacarino nas temperaturas 38 °C (a); 41 °C (b) e 44 °C (c)

Ao realizar a hidrólise enzimática com 38 °C, foi possível verificar que indiferente da carga enzimática empregada houve a rápida liberação de glicose, pois nas 4 primeiras horas a formação de glicose esteve entre 10,02 a 17,80 g/L, exceto para carga enzimática de 15 FPU/g: 10 CBU/g, que não foi observada a formação dessa hexose. Já para temperatura de 41 e 44 °C, a formação de glicose nas primeiras 4h foi observada apenas quando a concentração mais alta da celulase foi utilizada (25 FPU/g), enquanto que com as outras cargas enzimáticas de celulase a sacarificação foi mais lenta, visto que a concentração de glicose foi verificada só com 8 horas de hidrólise. Ainda com 4 horas de hidrólise nas temperaturas de 41 e 44 °C e utilizando 25 FPU/g, foi observado que o aumento da  $\beta$ -glicosidase proporcionou uma maior quantidade desse polissacarídeo, ou seja, ao aumentar de 1:3 para 2:3 a carga de  $\beta$ -glicosidase, foi verificado aumento de 8,68 para 17,9 g/L de glicose na temperatura de 41 °C e de 9,12 para 16,23 g/L de glicose a 44 °C.

Em todas as temperaturas avaliadas foi observado que a hidrólise enzimática se deu mais rapidamente durante as primeiras 12 horas, seguindo da desaceleração do processo

77

devido ao acúmulo do produto formado. Com 12 horas de sacarificação, a concentração de glicose observada foi superior a 22,82; 21,16 e 30,24 g/L respectivamente para 38, 41 e 44 °C, o que representou uma variação em relação a concentração final de glicose de 65 a 80% a 38 °C; de 60 a 86% para 41 °C e 67 a 85% para 44 °C. Após essas 12 horas, a sacarificação se tornou mais lenta. Isso provavelmente pode ser explicado pelo fato que as celulases degradam rapidamente a celulose amorfa que está mais facilmente disponível e, com o passar do tempo, passa a consumir a celulose cristalina que está mais recalcitrante, dificultando a hidrólise, ou ainda pela inibição das enzimas pelos seus produtos da degradação.

As concentrações mais elevadas de açúcares no início do processo são o resultado de um equilíbrio adequado entre as enzimas, uma vez que uma maior quantidade de celulase adicionada no processo promove uma rápida hidrólise da celulose em celobiose e a suplementação com quantidades apropriadas de β-glicosidase converte celobiose em glicose.

Além disso, o aumento da temperatura de trabalho de sistemas onde ocorrem reações enzimáticas tem dois efeitos opostos: de um lado o aumento da temperatura, até certo limite, aumenta a atividade da enzima e, portanto, a conversão de substrato em produto. Porém, temperaturas acima de certos limites reduzem gradativamente a atividade pela distorção do centro ativo da enzima, até inativá-la completamente, devido a sua desnaturação térmica (CARVALHO, 2011).

Ao final do tempo de sacarificação (48 horas) na temperatura de 38 °C, a concentração de glicose variou entre 28,20 a 53,12 g/L, conforme a carga enzimática empregada, enquanto que com a temperatura de 41 °C a quantidade desse açúcar variou entre 33,68 e 47,26 g/L e, quando utilizada a temperatura de 44 °C, essa variação de glicose foi de 36,2 a 46,12 g/L.

Para 38 e 41 °C, o aumento da carga enzimática de  $\beta$ -glicosidase adicionada de 1:3 para 2:3 proporcionou a maior taxa de hidrólise enzimática devido à conversão de celobiose em glicose. Para 38 °C, o aumento de 1:3 para 2:3 promoveu uma elevação da concentração de hexose de 3,42; 3,02 e 3,62 g/L quando utilizada a carga enzimática de 15, 20 e 25 FPU/g, respectivamente. Já um aumento na liberação de glicose de 9,14; 2,44 e 13,58 g/L quando utilizado 15, 20 e 25 FPU/g, respectivamente, se deu aumentando a dose da  $\beta$ -glicosidase de 1:3 para 2:3.

Esse resultado demonstra a importância de adicionar a  $\beta$ -glicosidase como complemento, pois embora as celulases sejam formadas pelo complexo enzimático cujas enzimas endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase estejam presentes, estes se encontram em níveis considerados baixos, sendo que a atuação das celulases gera celobiose mais rapidamente que a conversão da celulose em glicose, e o acúmulo desse dissacarídeo normalmente exerce efeito inibitório devido à falta de concentrações

adequadas de β-glicosidase. A adição de uma quantidade extra de β-glicosidase ajuda a remover esse efeito inibitório, permitindo o aumento da eficiência da atividade enzimática e melhorando a conversão de celulose em glicose (CAMARGO et al., 2014).

Para temperatura de 44 °C o aumento da  $\beta$ -glicosidase de 1:3 para 2:3 reduziu em 4,00; 5,22 e 3,58 g/L a quantidade de glicose quando utilizado 15, 20 e 25 FPU/g, respectivamente. De acordo com Rabelo (2010), grandes concentrações de  $\beta$ -glicosidase provavelmente levam à alta adsorção desta enzima pela lignina residual, o que acaba ocasionando um recobrimento do material lignocelulósico, diminuindo os sítios ativos e impedindo o ataque da enzima à celulose.

Em trabalho de Srinorakutara et al. (2014), ao avaliar a otimização da hidrólise de palha de cana, verificou-se que a biomassa deslignificada com de 2% m/v de NaOH, prétratada com 2% m/v de  $H_2SO_4$  em autoclave e seguida da hidrólise enzimática com 50 FPU/g de celulase, com 15% m/v de substrato a 50 °C em pH 5 resultou em 117,16 g/L de açúcares em 48 horas.

Yabefa, Ocholi e, Odubo (2014), ao avaliarem diferentes temperaturas (30; 37; 40; 50 e 55 °C) na hidrólise enzimática do mesocarpo da laranja, verificaram que a temperatura ótima encontrada foi 37 °C e, segundo os autores, a desnaturação da enzima começou num tempo de reação de 20 horas à temperatura de 55 °C.

De maneira geral, pode-se perceber, com os resultados, que o aumento da dosagem da celulase adicionada promoveu a maior liberação de glicose no meio, ou seja, ao aumentar de 15 para 20 e para 25 FPU/g da celulase, possibilitou a maior hidrólise enzimática da celulose, indiferente da temperatura avaliada. A condição que liberou maior concentração de glicose (53,12 g/L) foi 25 FPU de celulase por grama de biomassa, na proporção de 2:3 da β-glicosidase em relação à celulase e temperatura de 38 °C. Embora as temperaturas ótimas indicadas pelo fabricante da celulase NS22086 e β-glicosidase NS22118 sejam 45-50 °C e 45-70 °C, respectivamente. Bons resultados foram verificados para as temperaturas mais baixas usadas nesse trabalho (38 °C) com maior carga das celulase (25 FPU/g). Esse resultado é favorável para a SSF com K. marxianus, levedura termoresistente que, apesar de tolerar temperaturas acima de 40 °C, tem um melhor desempenho na formação de etanol a 40 °C, conforme demonstrado por Rodrigues et al. (2015). Esses autores, ao estudarem a influência da temperatura (30 a 40 °C), observaram que esta temperatura (40 °C) apresentou o melhor resultado na produção de etanol por K. *marxianus* ATCC 36907 (Q<sub>P</sub>: 3,96 g/L.h<sup>-1</sup> e Y<sub>E/G</sub>: 0,46 g/g) em meio sintético. Enquanto Lark et al. (1997), ao avaliarem diferentes temperaturas (30; 34; 38 e 42 °C) na produção de etanol por K. marxianus ATCC 36907, verificaram que a 34 °C foi a condição que proporcionou a melhor produção de etanol (50 g/L).

O rendimento obtido de glicose a partir da celulose ao final das 48 horas de hidrólise enzimática para as diferentes temperaturas estudadas e a concentração da carga enzimática se encontra disposto na Tabela 11.

	15 FPU/g		20 F	FPU/g	25 FPU/g		
T (°C)	5 CBU/g	10 CBU/g	6,67 CBU/g 13,35 CBU/		8,35 CBU/g	16,6 CBU/g	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
38	47	54	72	77	84	91	
41	58	74	75	78	61	81	
44	81	77	80	79	76	75	

Tabela 11 Rendimento de glicose obtido com diferentes temperaturas e carga enzimática na hidrólise enzimática de bagaço de sorgo sacarino

Conforme os resultados, é possível verificar que o rendimento esteve entre 47 e 91%, demonstrando que as diferentes condições avaliadas influenciaram na hidrólise enzimática da biomassa, o maior rendimento foi obtido com 38 °C quando se emprega 25 FPU/g de celulase e 16,6 CBU/g de β-glicosidase.

Para 38 e 41 °C o aumento de 15 para 25 FPU/g nas maiores concentrações de βglicosidase (2:3) proporcionou um incremento no rendimento da hidrólise de 41 e 11%, respectivamente, enquanto que para 44 °C essa mesma condição reduziu em 2% o rendimento da hidrólise.

Com os resultados, ainda foi verificado que o aumento de 38 para 41 e para 44 °C quando empregada a concentração de celulase de 15 ou 20 FPU/g e, indiferente da quantidade de  $\beta$ -glicosidase, resultou na melhora do rendimento da glicose. Já com 25 FPU/g, para a maior quantidade de  $\beta$ -glicosidase (2:3), foi verificado que o aumento da temperatura de 38 para 41 e para 44 °C reduziu o rendimento de hidrólise em 10 e 16%.

Com isso, foi verificado que a maior quantidade de celulase (25 FPU/g) e a maior carga de β-glicosidase (16,6 CBU/g) resultaram na condição que proporcionou os melhores resultados para rendimento da hidrólise da celulose em glicose. Cabe ressaltar que a temperatura é um fator de grande influência, além da hidrólise enzimática, sobre o próprio metabolismo microbiano. Contudo, esse parâmetro é importante ser novamente estudado ao empregar o processo de SSF empregando microrganismo termotolerante, a fim de obter bons rendimentos para o conjunto do processo.

Em trabalhos de Vásquez et al. (2007) visando à otimização dos parâmetros pH (5; 5,5 e 6), quantidade de sólidos (2; 6 e 10%), temperatura (30; 40 e 50 °C) e carga enzimática (5; 17,5 e 30 FPU/g) na hidrólise enzimática da fração celulose da celulignina de bagaço de cana, verificou-se que a carga enzimática e temperatura são os fatores que tem maior influência no aumento do rendimento de glicose. Segundo os autores, a condição ótima na obtenção da maior concentração de glicose (58,4 g/L) durante hidrólise enzimática foi temperatura de 47 °C, carga enzimática de 25,6 FPU/g, 10% massa sólida e o pH entre 5 e 6 não apresentou nfluência no comportamento da hidrólise enzimática da celulose em

glicose. A biomassa de bagaço de cana utilizada foi deslignificada com NaOH (4% m/v) 121 °C, por 30 minutos e hidrolisada com GC 220 em shaker a 150 rpm.

Lu et al. (2012), quando trabalharam com caniço (reed), planta semelhante à cana, (2% m/v) pré-tratado com explosão a vapor (180 °C, 20 min), também mostraram que o aumento da carga enzimática proporcionou uma maior conversão de celulose. Estes autores reportaram um aumento de 55% para 75% na conversão de celulose em glicose quando a carga enzimática passou de 5 para 25 FPU/g ao final de 72 horas de hidrólise. Além disso, nesse mesmo trabalho os autores verificaram que o aumento da temperatura durante a hidrólise de 36 para 50 °C resultou no aumento de 65 para 75% na conversão da celulose.

Sun e Cheng (2004), ao estudarem o efeito de diferentes cargas enzimáticas de celulases (5; 10; 15 FPU/g) suplementadas com diferentes níveis  $\beta$ -glicosidase (0, 25 e 50 CBU/g), ambas Novozyme 188, na eficiência da bioconversão da palha de centeio (50 °C e 100 rpm), também verificaram que o aumento de 5 para 15 FPU/g promoveu elevação de 48 para 73% na taxa de produção de glicose nas duas primeiras horas de hidrólise. Também verificaram que a adição concomitante de 15 FPU/g de celulase e 25 CBU/g de  $\beta$ -glicosidase promoveu melhores taxas de conversão de celulose (38%) em relação à ausência de  $\beta$ -glicosidase (36%). Além disso, um rendimento de glicose em 8 horas de sacarificação foi igual a 24 horas (60 mg/g de glicose) sem adição da  $\beta$ -glicosidase. Segundo os autores, a suplementação com a  $\beta$ -glicosidase hidrolisa completamente a taxa de produção de glicose durante a fase inicial da reação enzimática e melhora a conversão em glicose.

Castro (2011), quando trabalhou com palha de arroz (8% m/v) pré-tratada com ácido diluído (1:10 m/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30 min, 126 °C), também mostrou que o aumento da carga enzimática proporcionou um maior rendimento de hidrólise. Este autor utilizou o extrato enzimático Cellubrix e reportou que o aumento de 10 para 25 FPU/g proporcionou um aumento de 22% para 36% no rendimento da conversão da celulose em glicose com 24 horas de hidrólise a 45 °C e 100 rpm. Além disso, verificou que o efeito da suplementação com extrato de  $\beta$ -glicosidase Novozyme 188 promoveu um aumento médio de 20% quando comparados aos ensaios não suplementados. Os maiores rendimentos de hidrólise (acima de 50%) foram obtidos com carga de 25:25 (FPU/g: Ul/g). Foi também possível verificar que o excesso de atividade de  $\beta$ -glicosidase não proporciona um aumento no rendimento de hidrólise.

A diferença entre os resultados obtidos neste trabalho e os relatados na literatura pode ser explicada pelas características do substrato utilizado, pela quantidade de hemicelulose e lignina residual, bem como pelo tipo da enzima utilizada. Porém, pode-se considerar que a hidrólise enzimática foi satisfatória em relação aos dados descritos na literatura, devido à alta quantidade obtida e os bons rendimentos da glicose empregando essas enzimas na biomassa de sorgo sacarino.

# 5.7.3 Sacarificação simultânea à fermentação com K. marxianus

### 5.7.3.1 Variação da concentração de açúcares e produção de etanol

Na Figura 32 estão demonstrados os perfis de consumo de celobiose, glicose e produção de etanol durante a SSF da biomassa de bagaço de sorgo por *K. marxianus* nas temperaturas de 38; 41 e 44 °C empregando 25 FPU/g de celulase e 16,6 CBU/g de  $\beta$ -glicosidase. Conforme pode ser verificado, para as três condições estudadas ocorreram formação de celobiose nas primeiras horas de hidrólise. Vale ressaltar que foi realizada uma pré-hidrolise por 4 horas antes de inocular a levedura de *K. marxianus*, a fim de que, quando o inóculo fosse adicionado, o mesmo não sofresse com a falta de substrato, sendo que o momento da adição do inóculo foi denominado de tempo 0.

Esse resultado de formação de celobiose demonstra a atividade eficiente das enzimas celulases em hidrolisar a celulose, visto que esta faz a conversão de celulose, principalmente nesse dissacarídeo. Para o tempo 0, os maiores valores observados desse polissacarídeo foram de 3,44; 2,58 e 0,91 g/L respectivamente para 38, 41 e 44 °C. A partir desse tempo ocorreu a redução nas concentrações de celobiose tanto para 41 e 44 °C, demonstrando alta atividade da  $\beta$ -glicosidase. Já a 38 °C a concentração se manteve próxima a 5 g/L e decresceu apenas a partir das 48 horas.

Ao final das 72 horas do processo de SSF cerca de 40; 4 e 12% do conteúdo total de celobiose formado estavam presentes no meio de cultura respectivamente a 38, 41 e 44 °C. Esses resultados indicam que a atividade enzimática estava mais lenta em razão da temperatura mais baixa empregada (38 °C), demonstrando novamente a importância desse fator no processo.

Com relação à glicose, a maior concentração para cada temperatura foi obtida no momento da adição do inóculo (tempo 0) e, a partir desse momento, ocorreu a redução da mesma, devido ao consumo pelo microrganismo. A maior concentração de glicose (49,26 g/L) foi observada no experimento à 44 °C, reforçando que a atividade enzimática é maior com temperaturas mais elevadas. Quando as temperaturas empregadas foram 38 e 41 °C os valores estavam próximos entre si (44 g/L) para o tempo inicial.



Figura 32 Variação da concentração de celobiose ( $\rightarrow$ ), glicose ( $\rightarrow$ ) e etanol ( $\rightarrow$ ) em SSF de biomassa de bagaço de sorgo sacarino com *K. marxianus* em diferentes temperaturas: 38 °C (a); 41 °C (b) e 44 °C (c).

Ainda é possível considerar que, embora a maior quantidade de glicose tenha sido observada no início da fermentação com 44 °C, essa mesma condição é que demonstrou ter a maior quantidade de glicose residual (24,92 g/L) ao final do processo de fermentação, ou seja, apenas 50% dessa hexose foi metabolizada pelo microrganismo. Essa quantidade elevada de glicose sugere que as enzimas ainda estariam em atividade ao final da fermentação ou que a temperatura foi elevada para o microrganismo, comprometendo seu metabolismo e assimilação de glicose.

A produção de etanol, por sua vez, foi observada em todas as temperaturas estudas, e sua formação começou logo nas primeiras horas de fermentação. Além disso, nota-se que a máxima concentração de etanol foi alcançada (9,41 g/L) com 72 horas a 41 °C. Para 38 °C, ainda foi observado que em 24 horas a concentração de etanol era de 8,65 g/L e, até o final do processo, apenas um aumento de 0,31 g/L foi obtido, o que indica que a carbono tenha sido direcionado para a formação de biomassa ou de subprodutos da fermentação, visto que a glicose foi amplamente consumida (Tabela 12). Já a produção de etanol a 41 °C aumentou 0,45 g/L em relação a quando empregada a temperatura de 38 °C, chegando a uma valor final de 9,41 g/L.

A menor produção de etanol foi obtida (6,57 g/L) no experimento realizado a 44 °C. Esse resultado provavelmente é atribuído à severidade da temperatura, pois, embora as temperaturas mais altas sejam conhecidas por melhorar a atividade enzimática, quando muito elevadas podem limitar o processo fermentativo. Ainda que o microrganismo utilizado

nesse estudo seja termotolerante e consiga sobreviver a temperaturas mais altas, em condições extremas, seu metabolismo pode ser afetado, reduzindo a formação de produto.

Concentrações de etanol (11,5 g/L) próximas às obtidas neste experimento foram encontradas em experimento que empregou palha de arroz pré-tratada com 1% (m/v) de  $H_2SO_4$ , 120 °C, 30 min e submetidos à SSF com *K. marxianus* utilizando 8% de sólido, 25 FPU/g de celulase Cellubrix e 25 UI/g de  $\beta$ -glicosidase de Novozymes 188 com 1 g/L de inóculo, conduzidos a 35 °C e 100 rpm. Já a concentração de etanol diminiu para 6,62 g/L quando as mesmas condições foram empregadas porém a temperatura reduzida para a 30 °C (CASTRO; ROBERTO, 2014).

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados deste trabalho para o consumo de substrato, o número de células, pH e os parâmetros fermentativos obtidos ao final das 72 horas de fermentação com *K. marxianus* – conforme as diferentes temperaturas utilizadas. É possível verificar que o aumento da temperatura de 38 para 41 °C promoveu o aumento do crescimento celular, demonstrando que o aumento de etanol está diretamente relacionado à quantidade de biomassa microbiana, pois o aumento da mesma é necessário para formação do produto.

Tabela 12 Consumo de glicose, número de células, pH e parâmetros fermentativos dos<br/>ensaios com diferentes temperaturas de SSF de bagaço de sorgo sacarino por *K. marxianus*TemperaturaConsumoNúmero de<br/>glicose (%)pH $Y_{E/C}$  $Q_p$ ECC°Cglicose (%)células\*10<sup>9</sup>/ml(g.g<sup>-1</sup>)(g/L.h<sup>-1</sup>)(%)

romporatara	Contourno		P''	E/C	×р	200	
°C	glicose (%)	células*10 <sup>9</sup> /ml		(g.g⁻¹)	(g/L.h <sup>-1</sup> )	(%)	
38	80	1,9	4,33	0,25	0,12	62,87	
41	65	2,3	4,42	0,32	0,13	66,03	
44	50	1,7	4,54	0,26	0,09	46,10	
							_

 $Y_{E/C}$ : Fator de conversão de substrato em etanol (g/g); ECC: Rendimento da glicose a partir da celulose (%);  $Q_P$ : Produtividade volumétrica do produto (ex: g/L.h<sup>-1</sup>).

A redução no crescimento e atraso na produção de etanol por *K. marxianus* DMKU3-1042 também foram observados em trabalhos com o aumento da temperatura de 40 para 45 °C em meio sintético, contendo 20 g/L de glicose (RODRUSSAMEE et al., 2011).

Por outro lado, com o aumento da temperatura (44 °C) houve um menor consumo de glicose, provavelmente porque o processo de sacarificação da celulose ainda estava ocorrendo, o que pode ter comprometido a formação de biomassa microbiana, além do efeito da temperatura sobre o crescimento do microrganismo.

Considerando que o pH inicial era 4,5 e o meio utilizado estava tamponado, ainda assim foi verificado, para temperatura de 38 e 41 °C um decréscimo no valor de pH, enquanto que a 44 °C não houve uma variação tão significativa. Essa variação de pH provavelmente se deu em razão da formação de subprodutos, tais como ácidos fracos, durante o processo de fermentação, ou ainda à formação de CO<sub>2</sub>.

Com relação aos parâmetros fermentativos, foi observado que o rendimento ( $Y_{E/C}$ ) decresceu de 0,32 para 0,25 g/g quando a temperatura foi diminuída de 41 para 38 °C. Nota-se, por sua vez, que o aumento da temperatura de 41 para 44 °C diminuiu o  $Y_{E/C}$  em 18,75%, Com relação aos valores de produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) em etanol obtidos na temperatura de 41 °C, foi maior que as obtidas com 38 e 44 °C. Observa-se ainda que a 41 °C a eficiência de fermentação em SSF foi maior em 5 e 20% respectivamente, em relação à temperatura de 38 e 44 °C. Esses resultados indicam que temperaturas baixas ou elevadas afetam a conversão de glicose em álcool pela levedura. Esses resultados provavelmente estejam também relacionados à menor biomassa celular obtida nessas condições.

Rendimento de etanol (0,31 g/g) foi obtido com *K. marxianus* CECT 10875 para bagaço de sorgo sacarino pré-tratado com explosão a vapor em experimento de SSF a 42 °C, utilizando 15 FPU/g de celulase comercial Celluclast com média 56 g/L de glicose hidrolisada da biomassa após o pré-tratamento com explosão a vapor (BALLESTEROS et al., 2004).

Camargo et al. (2014), quando avaliaram a concentração de enzimas celulases e  $\beta$ glicosidase (10, 15 and 20 FPU g<sup>-1</sup> de celulase NS22086 e 1/3; 1,5/3 e 2/3 de  $\beta$  - glicosidase NS22118 em relação à celulase) na produção de etanol em SSF empregando a mesma levedura deste estudo e biomassa de farelo de girassol pré tratada com 6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (m/v), 121 °C, 20 minutos e deslignificada com 1% NaOH, obtiveram as melhores condições para produção de etanol com 20 FPU/g de celulase e 15 CBU  $\beta$ -glicosidase, resultando em 27,88 g.L<sup>-1</sup> de etanol, rendimento de 0,35 g/g e produtividade de 0,38 g.L<sup>-1</sup>.h. Nessa mesma condição, foi verificada a melhor porcentagem na eficiência de conversão enzimática – ECC (21,95%).

Wanderley, Soares e Gouveia (2014), quando estudaram a sacarificação simultânea à fermentação de bagaço de cana-de-açúcar tratado com explosão a vapor, (200 °C, 7 minutos) e deslignificado (1% de NaOH, 30 min a 100 °C) e empregando 0,4 g/L de inóculo de *S. cerevisiae UFPEDA 1238* com uma concentração inicial de 100 g/L de glicose, reportaram um favorecimento no processo de produção de etanol pelo microrganismo com aumento de inóculo de 0,5 para 4 e 8 g/L (Yp/s 0,25; 0,35 e 0,43 g/g e concentração de 11,3; 22,08 e 37,16 g/L de etanol respectivamente para 0,5; 4 e 8 g/L de inóculo). Nesse caso, o processo de SSF foi realizado empregando 8% de sólidos, 10 FPU/g de Celluclast e 5% v/v de β-glicosidase em relação à celulase, a 37 °C a 80 rpm. Nesse sentido, é verificada a importância da concentração celular inicial para um processo mais eficiente, e a partir desses resultados é indicado o aumento nas concentrações iniciais em trabalhos futuros que empreguem a SSF com esta levedura, a fim de obter melhores rendimentos e produtividade.

## 5.7.3.2 Formação de subprodutos

Além da produção de etanol para as diferentes temperaturas também foi monitorada a produção de xilitol, ácido acético e glicerol por *K. marxianus* durante à SSF e os resultados estão demonstrados na Figura 33. Na temperatura de 38 °C, foi observado que a partir das 36 horas houve a formação de xilitol e, ao final da fermentação, uma concentração de 3,12 g/L estava presente. Além da formação de xilitol para essa mesma temperatura, ao final do processo uma concentração de 1,23 e 0,5 g/L de ácido acético e glicerol foram também obtidas, respectivamente.

Já para a temperatura de 41 °C o dobro de xilitol (6,44 g/L) foi verificado após 72 horas, enquanto que o ácido acético (0,65 g/L) e o glicerol (0,35 g/L) encontravam-se em menores concentrações em relação à temperatura inferior estudada (38 °C). Na temperatura mais elevada (44 °C) apenas foi verificada formação de glicerol.

A redução de pH, como demonstrado anteriormente (Tabela 12), parece ter sido influenciada diretamente pela formação de ácido acético, no qual o menor valor de pH coincide com a maior concentração de ácido acético no meio (38 °C).



Figura 33 Variação da concentração de xilitol ( $\neg$ X-), ácido acético ( $\neg$ D-) e glicerol ( $\neg$ O-) para temperatura de 38 °C (a), 41 °C (b) e 44 °C (c) nos experimentos de SSF com *K. marxianus* ATCC 36907 e biomassa de bagaço de sorgo sacarino.

Em *K. marxianus* ATCC 36907 o etanol é o principal produto derivado do metabolismo da glicose pela levedura, enquanto em meio contendo xilose, o xilitol é produzido como o produto principal e etanol como um subproduto (SILVA et al., 2014). A

presença de xilitol neste trabalho, portanto, indica que parte da hemicelulose residual, presente mesmo após o pré-tratamento, foi hidrolisada à xilose e esta utilizada como substrato pela levedura. A presença de ácido acético encontrada tanto na temperatura de 38 e 41 °C também pode ter sido consequência da degradação da porção acetil da hemicelulose.

O glicerol é um produto secundário da fermentação e está acoplado à manutenção do equilíbrio oxi-redutor da célula, que é alterado pela presença de ácidos orgânicos, estresse osmótico e excesso de biomassa (SAITO; CABELLO, 2006). Além disso, a maioria das leveduras produzem glicerol como resultado do estresse pela presença de etanol como meio alternativo de regeneração de NAD<sup>+</sup> (VRIESEKOOP; HAASS; PAMMENT, 2009). Ou seja, o glicerol é produzido e acumula-se na célula como resposta à pressão osmótica e tem um papel no equilíbrio redox da célula dos microrganismos e, em condições anaeróbicas, é formado para re-oxidar o NADH formado no anabolismo e na síntese de ácidos orgânicos (PINHEIRO et al., 2008).

Camargo, Gomes e Sene (2014) também verificaram a formação de glicerol (0,96-2,62 g/L) e de xilitol (0,11-0,46 g/L) como subprodutos durante a SSF para produção de etanol pela mesma levedura utilizada neste estudo. Os experimentos ocorreram a partir da variação da carga enzimática em 10, 15 and 20 FPU/g Celulase NS22086 e 1.5:1; 2:1 e 3:1 de  $\beta$ -Glucosidase NS22118, empregando biomassa de farelo de girassol (8%) pré tratada com 6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (m/v), 121 °C, por 20 min.

# **6 CONCLUSÕES**

Ao avaliar o bagaço do sorgo sacarino como matéria prima para produção de etanol de segunda geração, concluiu-se que:

 As diferentes cultivares de sorgo sacarino apresentaram-se semelhantes entre si, com porcentagens de celulose variando entre 32,9 e 37,0%, hemicelulose 30,69 e 32,01% e lignina 22,13 e 26,48%. A semelhança na composição com outras biomassas indicam boas possibilidades para sua utilização em bioprocessos, como a produção de etanol;

 A hidrólise ácida com 1,75% de ácido sulfúrico, a 121 °C e 40 minutos, proporcionou uma remoção de hemicelulose de 60%, resultando num hidrolisado hemicelulósico com teor de 14,22 g/L de xilose, 2,42 g/L de glicose e 0,95 g/L de arabinose. A necessidade de concentrar o hidrolisado até concentração próxima a 50 g/L de xilose promoveu também a elevação da concentração dos compostos inibitórios, como ácido acético, furfural, HMF e fenólicos, fazendo necessária uma etapa de destoxificação;

• *S. stipitis* foi capaz de crescer no hidrolisado hemicelulósico, consumindo de maneira eficiente os açúcares (99% de xilose) e produzindo 22 g/L de etanol, com rendimento de 0,40 g/g e produtividade 0,34 g/L.h<sup>-1</sup>. Esses resultados são satisfatórios e semelhantes aos encontrados na literatura, o que demonstra que o bagaço de sorgo sacarino é uma biomassa alternativa e promissora para a produção de etanol a partir de pentoses;

 O tratamento da celulignina residual com 2,5% de NaOH por 60 minutos removeu grande parte da lignina (68%) com baixa concentração de base, resultando em quantidade de celulose superior a 80%;

 A sacarificação da celulose a 38 °C com 25 FPU/g de celulase suplementada com 16,6 CBU/g de β-glicosidase levou a maior concentração final de glicose;

Durante a SSF da porção celulósica por *K. marxianus* a produção de etanol foi afetada pela temperatura, com máxima concentração de etanol de 9,41 g/L a 41 °C em 72 horas de fermentação. Esses resultados são satisfatórios e também semelhantes aos relatados na literatura, evidenciando a possibilidade do emprego de sorgo sacarino na produção de etanol de segunda geração;

• O bagaço demonstra-se uma boa fonte de açúcares, o que o torna promissor em processos fermentativos que empregam pentoses e hexoses como meio de cultura.

# 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho a partir da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de sorgo e da SSF demonstram que o bagaço de sorgo tem um grande potencial para o uso como meio de fermentação para a produção de etanol a partir de pentoses e hexoses, aparecendo como uma biomassa viável para o uso integral de suas frações no campo da biorrefinaria, o que contribui para consolidação do setor na produção de etanol de segunda geração.

Embora os objetivos tenham sido alcançados e bons resultados tenham sido obtidos, cabe ressaltar que novas propostas de trabalho devem ser realizadas a fim de que sejam melhorados os rendimentos. Entre esses, pode-se citar a realização de estudos a partir de fatores que interferem no metabolismo dos microrganismos, tanto para *S. stiptis* como para *K. marxianus*, tais como pH, temperatura, concentração do substrato, sensibilidade da levedura ao produto formado, como tolerância a etanol, necessidades nutricionais, oxigenação, carga de sólidos, entre outros, para maior entendimento de sua interferência no processo fermentativo e melhoria dos resultados a partir da otimização desses parâmetros. Além disso, outros estudos podem ser realizados empregando esta matéria-prima em processos biotecnológicos para formação de outros produtos de interesse comercial, como xilitol.

Ressalta-se ainda a importância de avaliar pré-tratamentos diferenciados do bagaço de sorgo que possibilitem aumentar a acessibilidade da celulose às enzimas, visando aumentar o rendimento da hidrólise e promovendo a maior liberação de xilose a partir da porção hemicelulósica. Além disso, estudos que utilizam outros microrganismos termotolerantes como *S. cerevisiae* geneticamente modificado em SSF da biomassa de bagaço de sorgo sacarino podem contribuir para aumento da produção de etanol. Também estudos que empreguem enzimas como as xilanases devem ser estudadas para melhorar a conversão da porção hemicelulósica em pentoses, o que poderia auxiliar no aumento da conversão das pentoses.

Contudo, esse trabalho ajudou no conhecimento, na discussão e no aprendizado sobre processos biológicos e principalmente sobre as questões abrangentes e metodológicas em relação à produção de bioetanol e ao emprego de tecnologia inovadora e resultados promissores à utilização da biomassa lignocelulósica na área de energia sustentável. Além disso, esse trabalho contribuiu para diversificação de matéria prima como bagaço de sorgo nos processos fermentativos, produção intelectual e contribuições para consolidação da área de pesquisa junto ao programa de Mestrado e Doutorado em Engenharia Agrícola.

ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON, L. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. **AMB Express**, Paranaque, v. 4, n. 46, maio 2014.

AGBOGBO, F. K.; Coward-Kelly, G. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, Londres, v. 41, n. 11, p. 2333-2336, novembro 2006.

AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, n. 9, p. 1515-1524, setembro 2008.

AGBOGBO, F. K.; WENGER, K. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 34, n. 11, p. 723-737, 2007.

ALBUQUERQUE, C. J.,; TARDIN, F. D; PARRELLA, R A C; GUIMARÃES, A S; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, K. M. Sorgo sacarino em diferentes arranjos de plantas e localidades de minas gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 11, n. 1, p. 69-85, 2012.

ALOISIO, L; SANTIS, A.; SPERA, D. M.; PIGNATELLI, V.; ALBERGO, R. Innovative of second generation ethanol production from biomass crops by *Pichia stipitis*. **Chemical Engineering Transactions**, Milano, v. 38, p. 115-120, 2014.

ALVES, L. A.; FELIPE, M G. A.; ALMEIDA, J. B.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 70, n. 1, p. 89-98, março 1998.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, julho 2010.

AMORES, I.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; SÁEZ, F.; MICHELENA, G.; BALLESTEROS, M. Ethanol production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. **Electronic Journal of Energy & Enviroment,** Temuco, v. 1, n. 1, 2013.

ANP. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis, 2014. Disponivel http://www.esp.gov.br/2005.704208m\_8t4\_8t0\_8t4\_8cs\_8cs\_8t4\_447447420240

<http://www.anp.gov.br/?pg=78136&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1447417122349>. Acesso em: 13 nov. 2015.

ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; SANTOS, J. C.; ROSA, C. A.; SILVA, S. S. Bioethanol production from sugarcane bagasse by a novel brazilian pentose fermenting yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: evaluation of fermentation medium. **International Journal of Chemical Engineering**, Londres, v. 2014, p. 1-8, 2014.

ARISTIDOU, A.; PENTILA, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, Massachusetts, v. 11, n. 2, p. 187-198, abril 2000.

BALLESTEROS, M.; DOMINGUEZ, J. M. O.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, Londres v. 39, n. 12, p. 1843-1848, 2004.

BARAKAT, A.; MONLAU, F.; STEYER, J. P.; CARRERE, H. Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. **Bioresource Technology**, New York, v. 104, p. 90-99, 2012.

BARCELOS, C. A.; MAEDA, R. N.; BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA-Jr, N. The essentialness of delignification on enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse cellulignin for second generation ethanol production. **Waste and Biomass Valorization**, Netherlands v. 4, n. 2, p. 341-346, junho 2013.

BARCELOS, C. A.; MAEDA, R.; PEREIRA JR, N. Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) para produção de bietanol. **Boletim Técnico da Petrobras**, Rio de Janeiro, v. 54, n. 3, p. 29-46, dezembro 2011.

BELAL, E. B. Bioethanol production from rice straw residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 1, 2013.

BELLIDO, C.; BOLADO, S.; COCA, M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, New York, v. 102, n. 23, p. 10868-10874, dezembro 2011.

BELLIDO, C.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, New York, v. 133, p. 51-58, abril 2013.

BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA JR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production: Part II: Hemicellulose hydrolysate fermentability. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 13, n. 5, p. 14-15, 2010.

BONDESSON, P.-M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Ethanol and biogas production after steam pretreatment of corn stover with or without the addition of sulphuric acid. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 6, n. 11, 2013.

BOUSSARSAR, H.; ROGÉ, B.; MALTHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. **Bioresource Technology**, New York, v. 100, n. 24, p. 6537-6542, dezembro 2009.

BRÁS, T.; GUERRA, V.; TORRADO, I.; LOURENÇO, P.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; NEVES, L. A. Detoxification of hemicellulosic hydrolysates from extracted olive pomace by diananofiltration. **Process Biochemistry**, Londres v. 49, n. 1, p. 173-180, janeiro 2014.

BUCKERIDGE, M. S.; SOUZA, A. P.; ARUNDALE, R. A.; ANDERSON-TEIXEIRA, K. J.; LUCIA, E.thanol from sugarcane in Brazil: a 'midway' strategy for increasing ethanol production while maximizing environmental benefits. **GCB Bioenergy**, Singapura, v. 4, n. 2, p. 119-1226, março 2012.

BURUIANA, C.-T.; VIZIREANU, C.; GARROTE, G.; PARAJÓ, J C. Optimization of corn stover biorefinery for coproduction of oligomers and second generation bioethanol using non-isothermal autohydrolysis. **Industrial Crops and Products**, Saint-Martin-d'Hères, v. 54, p. 32-39, 2014.
CADETE, R. M.; MELO, M. A; DUSSÁN, K. J.; RODRIGUES, R. C. L; SILVA, S. S.; ZILI, J. E.; VITAL, M J S; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian amazonian forest. **PLoS one**, California, v. 7, n. 8, p. 1-11, 2012.

CAMARGO, D.; GOMES, S. D; FELIPE, M. G. A.; SENE; L. Response of by-products of sunflower seed processing to dilute-acid hydrolysis aiming fermentable sugar production. **Journal of Food, Agriculture & Environment,** Helsinki, v. 12, n. 2, p. 239-246, 2014.

CAMARGO, D.; SENE, L.; VARIZ, D. I.; FELIPE, M. G. A. Xylitol bioproduction in hemicellulosic hydrolysate obtained from sorghum forage biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 175, n. 8, p. 3628-3642, abril 2015.

CAMARGO, D.; GOMES, S. D.; SENE, L. Ethanol production from sunflower meal biomass by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Heidelberg, v. 37, n. 11, p. 2235-2242, novembro 2014.

CAMARGO, D.; SENE, L. Production of ethanol from the hemicellulosic fraction of sunflower meal biomass. **Biomass Conversion and Biorefinery**, Heidelberg, v. 4, n. 2, p. 87-93, Junho 2014.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 333-336, abril-junho 2008.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. D.; SILVA, J. B.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 161, n. 1, p. 84-92, maio 2010.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; GIULETTI, M. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. Journal of Biomedicine and Biotechnology, Londres, v. 2012, n. 2012, 2012.

CARDOSO, W. S.; TARDIN, F. D.; TAVARES, G. P.; QUEIROZ, P. V.; MOTA, S. S.; KASUYA, M. C. M.; QUEIROZ, J. H. Use of sorghum straw (*Sorghum bicolor*) for second generation ethanol production: pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 623-627, 2013.

CARMO, J. R. A. **Produção de etanol e pectinase por** *Kluyveromyces marxianus* **CCT 4086 utilizando resíduos do processamento de café (***Coffea arabica* **L). 253 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, 2013.** 

CARVALHO, M. L. **Estudo Cinético da Hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2011.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; MORALES, M. L. V.; SOLENZAI, A. I. N. Detoxification of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate with ionexchange resins for xylitol production by calcium alginate-entrapped cells. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Malden, v. 79, n. 8, p. 863-868, agosto 2004.

CASEY, E.; SEDLAK, M.; HO, N. W. Y.; MOSIER, N. S. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of

Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Research, Singapura v. 10, n. 4, p. 385-393, junho 2010.

CASTRO, R. C. de A. Seleção de uma linhagem termotolerante de Kluyveromyces marxianus produtora de etanol e sua aplicação no processo de sacarificação e fermentação simultânea da celulignina de palha de arroz. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

CASTRO, R. C. A.; ROBERTO, I. C. Selection of a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 172, n. 3, p. 1553-1564, fevereiro 2014.

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

CHANDEL, A. K.; NASARU, M. L.; RUDRAVARAM, R.; POGAKU, R.; RAO, L. V. Bioconversion of de-oiled rice bran (dorb) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by *Pichia stipitis* NCM3499 under optimized conditions. **International Journal of Food Engineering**, Jiangsu, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2009.

CHANDEL, A. K.; CHANDRASEKHAR, G.; KONAKALLA, R.; RAVINDER, R.; RAVINDRA, P. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Malasia, v. 6, n. 1, p. 8-20, 2011.

CHATURVEDI, V.; VERMA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 3, n. 5, p. 415-431, setembro 2013.

CHAUD, L. C. S.; SILVA, D. D. V.; MATTOS, R. T.; FELIPE, M. G. A. Evaluation of oat hull hemicellulosic hydrolysate fermentability employing *Pichia stipitis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 55, n. 5, p. 771-777, setembro-outubro 2012.

CHEN, H.-Z.; LIU, Z.-H. Multilevel composition fractionation process for high-value utilization of wheat straw cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 7, n. 137, 2014.

CHERUBINI, F.; STROMMAN, A. H. Chemicals from lignocellulosic biomass: opportunities, perspectives, and potential of biorefinery systems. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Malden, v. 5, n. 5, p. 548-561, 2011.

COSTA, D. A.; SOUZA, C. J.; COSTA, P. S.; RODRIGUES, M. Q.; SANTOS, A. F.; LOPES, M. R.; GENIER, H. L.; SILVEIRA, W. B.; FIETTO, L. G. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. **Applied Microbiology Biotechnology**, Paranaque, v. 98, n. 8, p. 3829-3840, fevereiro 2014.

CUNHA, S. P. D.; SEVERO FILHO, W. A.. Avanços na obtenção de etanol a partir de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Tecno-lógica**, Santa Cruz, v. 14, n. 2, p. 69-75, julho- dezembro 2010.

DAGNINO, E. P.; CHAMORRO, E. R.; ROMANO, S. D.; FELISSIA, F. E.; AREA, M. C. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, Saint-Martin-d'Hères, v. 42, p. 363-368, março 2013.

DAHNUM, D.; TASUN, S. O.; TRIWAHYUNI, E.; NURDIN, M.; ABIMANYU, H. Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. **Energy Procedia**, Sweden, v. 68, p. 107-116, Abril 2015.

DALANHOL, K. C. F. **Avaliação do desempenho das leveduras** *Candida guilliermondi* e *Kluyveromyces marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maça. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, Macau, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DAYSTAR, J.; REEB, C.; GONZALEZ, R.; VENDITTI, R.; KELLEY, S. S. Environmental life cycle impacts of cellulosic ethanol in the Southern U.S. produced from loblolly pine, eucalyptus, unmanaged hardwoods, forest residues, and switchgrass using a thermochemical conversion pathway. **Fuel Processing Technology**, Perth, v. 138, p. 164-174, outubro 2015.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, R. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C E V.; FILHO, R. M.; BONOMI, A.; Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, New York, v. 103, n. 1, p. 152-161, janeiro 2012.

DIEN, B. S.; SARATH, G.; PEDERSEN, J. F.; SATTLER, S. E.; CHEN, H.; FUNNEL-HARRIS, D. L.; NICHOLS, N. N.; COTTA, M. A. Improved sugar conversion and ethanol yield for forage sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) lines with reduced lignin contents. **BioEnergy Research**, Dordrecht, v. 2, n. 3, p. 153-164, setembro 2009.

DING, M. Z.; WANG, X.; YANG, Y.; YUAN, Y. J. Metabolomic study of interactive effects of phenol, furfural, and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae*. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, Nova York, v. 15, n. 10, p. 647-653, 2011.

DOWE, N.; MCMILLAN, J. **SSF experimental protocols; lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation**. Report No. NREL/TP-510-42630, 2008. ed. Colorado: National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2008.

DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 8, n. 6, p. 360-364, junho 1986.

DUSSÁN, K. J.; SILVA, D. D. V.; MORAES, E. J. C.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Dilute-acid hydrolysis of cellulose to glucose from sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Transactions**, Milano, v. 38, p. 433-438, 2014.

DUSSÁN, K. J.; SILVA, D. D. V.; PEREZ, V. H.; SILVA, S. S. Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. **Renewable Energy**, Lemesos, v. 87, n. 1, p. 703-710, março 2016.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2009.

FELIPE, M. G. A.; VIEIRA, D. C.; VITOLO, M.; SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; MANCHILHA, I. M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, Heidelberg, v. 35, n. 3, p. 171-177, 1995.

FENG, Y.; QI, X.; JIAN, H. L.; SUN, R. C.; JIANG, J. X. Effect of inhibitors on enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification fermentation for lactic acid production from steam explosion pretreated lespedeza stalks. **BioResources**, New York, v. 7, n. 3, p. 3755-3766, 2012.

FERRARINI, M. D.; NEIROTTI, E.; ALBORNOZ, C.; SAUCEDO, E. Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, Malden, v. 40, n. 7, p. 753-759, outubro 1992.

FERREIRA, A. D.; MUSSATTO, S. I.; CADETE, R. M.; ROSA, C. A. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, Malden, v. 28, n. 7, p. 547-554, Julho 2011.

FERREIRA, P. G.; SILVEIRA, F. A.; SANTOS, R. C. V.; GENIER, H. L. A.; DINIZ, R. H. S.; RIBEIRO-Jr; J. I.; FIETTO, L. G.; PASSOS, F. M. L.; SILVEIRA, W. B. Optimizing ethanol production by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 in a mixture of sugarcane bagasse and ricotta whey. **Food Science and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, n. 2, p. 1421-1427, 2015.

PEREIRA FILHO, I. A.; PARRELLA, A. U C.; MOREIRA, J. A. A.; MAY, A.; SOUZA, V. F.; CRUZ, J. C. Avaliação de cultivares de sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (I.) moench] em diferentes densidades de semeadura visando a características importantes na produção de etanol. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 12, n. 2, p. 118-127, 2013.

FILOSO, S.; CARMO, J. B.; MARDEGAN, S. F.; LINS, S. R. M.; GOMES, T. F.; MARTINELLI,, L. A. Reassessing the environmental impacts of sugarcane ethanol production in Brazil to help meet sustainability goals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 52, p. 1847-1856, dezembro 2015.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Paranaque, v. 79, n. 3, p. 339-354, 2008.

FRANDEN, M. A.; PILATH, H. M.; MOHAGHEGHI, A.; PIENKOS, P. T.; ZHANG, M. Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 6, n. 99, 2013.

FU, N.; PEIRIS, P.; MARKHAM, J.; BAVOR, J. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 45, n. 3, p. 210-217, setembro 2009.

GARCIA, D. Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. 2012. 153 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, North Carolina, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GLADIS, A.; BONDESSON, P. M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of different SSF conditions on ethanol production from corn stover at high solids loadings. **Energy Science & Engineering**, Sweden, v. 3, n. 5, p. 481-489, 2015.

GNANSOUNOU, E.; DAURIAT, A.; WYMAN, C. E. Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. **Bioresource Technology**, New York, v. 96, n. 9, p. 985-1002, junho 2005.

GOSHADROU, A.; KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. **Industrial Crops and Products**, Saint-Martin-d'Hères, v. 34, n. 1, p. 1219-1225, julho 2011.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N. V.; DAWSON, K.; POWER, R. Effect of ph and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg v. 33, n. 6, p. 469-474, junho 2006.

GREETHAM, D. Presence of low concentrations of acetic acid improves fermentations using *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioprocessing & Biotechniques, Alabama, v. 5, n. 192, 2014.

GROOTJEN, D. R. J.; VAN DER LAN, R. G. J. M.; LUYBEN, K. C. A. M. Conversion of glucose/xylose mixtures by *Pichia stipitis* under oxygen-limited conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 13, n. 8, p. 648-654, 1991.

GUILHERME, A. A.; DANTAS, P. V. F.; SANTOS, E. S.; FERNANDES, F. A. N.; MACEDO, G. R. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 23-33, janeiro-março 2015.

GURGEL, L. V. A.; MARABEZI, K.; ZANBOM, M. D.; CURVELO, A. A. S. Dilute acid hydrolysis of sugar cane bagasse at high temperatures: a kinetic study of cellulose saccharification and glucose decomposition. Part I: sulfuric acid as the catalyst. **Industrial & Engineering Chemistry Research,** Pensilvania, v. 51, n. 3, p. 1173-1185, 2012.

GUTIÉRREZ-RIVERA, B.; ORTIZ-MUNIZ; B; GÓMEZ-RODRIGUEZ, J.; CÁRDENAS-CÁGAL, A.; GONZÁLEZ, J. M. D.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Bioethanol production from hydrolyzed sugarcane bagasse supplemented with molasses "B" in a mixed yeast culture. **Renewable Energy**, Lemesos, v. 74, p. 299-405, fevereiro 2014.

HAN, L.; FENG, J.; ZHANG, S.; MA, Z.; WANG, Y.; ZHANG X. Alkali pretreated of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 53-61, janeiro-março 2012.

HICKERT, L. R. **Otimização da hidrólise da casca de arroz** (*Oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

HILL, J., D.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **PNAS**, Washington, v. 103, n. 30, p. 11206-11210, julho 2006.

HU, N.; YUAN, B.; SUN, J.; WANG, S. A.; LI, F. L. Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains representing potentials for bioethanol production from Jerusalem artichoke by consolidated bioprocessing. **Bioenergy and Biofuels**, Lausanne, v. 95, n. 5, p. 1359-1368, setembro 2012.

IWAKI, A.; KAWAI, T.; YAMAMOTO, Y.; IZAWA, S. Biomass conversion inhibitors furfural and 5-hydroxymethylfurfural induce formation of messenger RNP granules and attenuate translation activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 5, p. 1661-1667, 2013.

JAFARI, V.; LABAFZADEH, S. R.; JEIHANIPOUR, A.; KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. Construction and demolition lignocellulosic wastes to bioethanol. **Renewable Energy**, Lemesos, v. 36, n. 11, p. 2771-2775, novembro 2011.

JARGALSAIKHAN, O.; SARAÇOğLU, N. Application of experimental design method for ethanol production by fermentation of sunflower seed hull hydrolysate using *Pichia stipitis* NRRL-124. **Chemical Engineering Communications**, Singapura, v. 196, n. 1-2, outubro 2008.

JEEVAN, P.; NELSON, R.; RENA, A. E. Optimization studies on acid hydrolysis of corn cob hemicellulosic hydrolysate for microbial production of xylitol, **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, Coden, v. 1, n. 4, p. 114-123, 2011.

JEFFRIES, T. W.; HEADMAN, J. R.; VLEET, H. V. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. **FEMS Yeast Research**, Singapura, v. 9, n. 5, p. 793-807, setembro 2009.

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

JOSHI, B.; BHATT, M. R.; SHARMA, D.; JOSHI, J.; MALLA, R.; SREERAMA, L. Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments. **Biotechnology and Molecular Biology**, Malasia, v. 6, n. 8, p. 172-182, novembro 2011.

JUNCHEN, L.; IRFAN, M.; LIN, F. Bioconversion of agricultural waste to ethanol: A potential source of energy. **Archives des Sciences**, Genova, v. 65, n. 12, p. 1661-1677, dezembro 2012.

KANG, H.-W.; KIM, Y.; KIM, S. W.; CHOI, G. W. Cellulosic ethanol production on temperature-shift simultaneous saccharification and fermentation using the thermostable yeast *Kluyveromyces marxianus* CHY1612. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Heidelberg, v. 35, n. 1, p. 115-122, 2012.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 38, n. 7, p. 803-807, 2011.

KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, Aberdeen, v. 26, n. 4, p. 361-375, abril 2004.

KIM, T. H.; JEON, Y. J.; OH, K. K.; KIM, T. H. Production of furfural and cellulose from barley straw using acidified zinc chloride. **Korean Journal of Chemical Engineering**, New York, v. 30, n. 6, p. 1339-1346, 2013.

KIMN, S. R.; SKERKER, J. M.; KANG, W.; LESMANA, A.; WEI, N.; ARKIN, A. P.; JIN, Y. S.. Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, California, v. 8, n. 2, 2013. KLINKE, H. B.; AHRING, B. K.; SCHMIDT, A. S.; THOMSEN, A. B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. **Bioresource Technology**, New York, v. 82, n. 1, p. 15-26, março 2002.

KUMAR, D.; MURTHY, G. S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. **Biotechnology for Biofuel**, Londres, v. 6, n. 1, maio 2013.

KUMAR, S.; DHEERAN, P.; SINGH, S. P.; MISHRA, M.; ADHIKARI, D. K. Bioprocessing of bagasse hydrolysate for ethanol and xylitol production using thermotolerant yeast. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Heidelberg, v. 38, n. 1, p. 39-47, janeiro 2015.

KUMDAM, H.; MURTHY, S. N.; GUMMADI, S. N. Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. **AMB Express**, Paranaque, v. 3, n. 24, p. 1-12, 2013.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, Manchester, v. 24, n. 1-2, p. 17-26, fevereiro-maio 2010.

LAPLACE, J. M.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, M. Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*: oxygen requirement as a key factor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Paranaque, v. 36, n. 2, p. 158-162, 1991.

LARK, N.; XIA, Y.; QIN, C. G.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast, Kluyveromyces marxianus. **Biomass and Bioenergy**, Ottawa, v, 12, n. 2, p. 135-143, 1997.

LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. **The Scientific World Journal**, Londres, v. 2014, p. 1-20, 2014.

LEE, T.-Y.; KIM, M. D.; KIM, K. Y.; PARK, K.; RYU, Y. W.; SEO, J. H. A parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Dordrecht, v. 5, n. 1, p. 27-31, 2000.

LI, J.; LI, S.; HAN, B.; YU, M.; LI, G.; JIANG, Y. A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet sorghum stalks into ethanol. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 6, n. 174, 2013.

LI, Y. Influence of metal addition on ethanol production with *Pichia stipitis* ATCC 58784. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 36, n. 4, p. 491-497, dezembro 2009.

LIMA, N. C.; SOUZA, G. H. S. A demanda do etanol e sua caracterização no mercado brasileiro de combustíveis. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v. 16, n. 4, p. 532-544, dezembro 2014.

LIN, L.; YAN, R.; LIU, Y.; JIANG, W. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 21, p. 8217-8223, novembro 2010.

LIN, Y.-S.; LEE, W. C. Simultaneous saccharification and fermentation of alkali-pretreated cogongrass for bioethanol production. **BioResources**, New York, v. 6, n. 3, p. 2744-2756, 2011.

LINDBERG, L.; SANTOS, A. X. S.; RIEZMAN, H.; OLSSON, L.; BETTIGA, M. Lipidomic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* reveals critical changes in lipid composition in response to acetic acid stress. **PLoS One**, California, v. 8, n. 9, p. 1-12, setembro 2013.

LINDE, M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Steam pretreatment of acid-sprayed and acid-soaked barley straw for production of ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 130, n. 1-3, p. 546-562, 2006.

LIU, T.; ZOU, W.; LIU, L.; CHEN, J. A constraint-based model of *Scheffersomyces stipitis* for improved ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 5, n. 72, 2012.

LIU, X.; LU, M.; AI, N.; YU, F.; JI, J. Kinetic model analysis of dilute sulfuric acid-catalyzed hemicellulose hydrolysis in sweet sorghum bagasse for xylose production. **Industrial Crops and Products**, Saint-Martin-d'Hères, v. 38, p. 81-86, julho 2012.

LU, J.; LI, X. Z.; ZHAO, J.; QU, Y. Enzymatic saccharification and ethanol fermentation of reed pretreated with liquid hot water. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Londres v. 2012, p. 1-9, 2012.

MAHLER, G. F.; GUEBEL, D. V. Influence of magnesium concentration on growth, ethanol and xylitol production by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology**, Dordrecht, v. 16, n. 4, p. 407-412, abril 1994.

MALAMIS, S.; KATSOU, E.; DASKALAKIS, N.; HARALAMBOUS, K. J. Investigation of the inhibitory effects of heavy metals on heterotrophic biomass activity and their mitigation through the use of natural minerals. Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, Abingdon, v. 47, n. 13, p. 1992-1999, 2012.

MARTIN, C.; ALRIKSSON, B.; SJODE, A.; NIVEBRANT, N. O; JONSSON, L. J.Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 137, n. 1, p. 339-352, abril 2007.

MARTÍN, C.; ROCHA, G. J. M.; SANTOS, J. R. A.; WANDERLEY, M. C. A.; GOUVEIA, E. R. Enzyme loading dependence of cellulose hydrolysis of sugarcane bagasse. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 10, p. 1927-1930, 2012.

MARTINEZ, E. A. **Estudo do processo de cristalização de xilitol obtido por via fermentativa.** 2005. 189 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2005.

MARTINIANO, S. E.; CHANDEL, A. K.; SOARES, L. C. S. R.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, S. S. Evaluation of novel xylose-fermenting yeast strains from Brazilian forests for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse. **3 Biotech**, Heidelber, v. 3, n. 5, p. 345-352, 2013.

MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA-SILVA, J. B.; PESSOA-JÚNIOR, A. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 9-21, janeiro-março 2006.

MATSUSHIKA, A.; NAGASHIMA, A.; GOSHIMA, T.; HOSHINO, T. Fermentation of xylose causes inefficient metabolic state due to carbon/energy starvation and reduced glycolytic flux in recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, California, v. 8, n. 7, p. 1-11, 2013.

MAY, A.; CAMPANHA, M. M.; SILVA, A. F.; COELHO, M.; PARRELLA, R. A. C.; SCHAFFERT, R. E.; FILHO, I. A. P. Variedades de sorgo sacarino em diferentes espaçamentos e população de plantas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 11, n. 3, p. 278-290, 2012.

MCINTOSH, S.; VANCOV, T. Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. **Biomass and Bioenergy**, Aberdeen, v. 35, n. 7, p. 3094-3103, julho 2011.

MEHMOOD, S.; GULFRAZ, M.; RANA, N. F.; AHMAD, A.; AHRING, B. K.; MINHAS, N.; MALIK, M. F. Ethanol production from sorghum bicolor using both separate and simultaneous saccharification and fermentation in batch and fed batch systems. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 8, n. 12, p. 2857-2865, 2009.

MELO, A. S.; SAMPAIO, Y. D. S. B. Impactos dos preços da gasolina e do etanol sobre a demanda de etanol no brasil. **Revista de Economia Contemporânea**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 56-83, janeiro-abril 2014.

MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. **3 Biotech**, Heidelber, v. 3, p. 373-379, outubro 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 21, n. 3, p. 426-428, 1959.

MILLS, T. Y.; SANDOVAL, N. R.; GILL, R. T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. **Biotechnology for Biofuel**, Londres, v. 2, n. 26, 2009.

MODIG, T.; LIDÉN, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, Londres, v. 363, p. 769-776, maio 2002.

MUDHOO, A.; KUMAR, S. Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass. **International Journal of Environmental Science and Technology**, Heidelberg, v. 10, n. 6, p. 1383-1398, novembro 2013.

MUSSATTO, S. I. Influência do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arrroz na produção de xilitol por *Candida guilliermondii.* 2002. 173 F. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2002.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 43, n. 2, p. 124-129, 2014.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, Londres, v. 40, n. 12, p. 3801-3806, 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Food Science and Technology,** Campinas, v. 24, n. 1, p. 94-100, janeiro/março 2004.

MUSSATTO, S. I.; SANTOS, J. C.; ROBERTO, I. C. Effect of pH and activated charcoal adsorption on hemicellulosic hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Malden, v. 79, n. 6, p. 590-596, junho 2004.

MUSSATTO, S. I.; SILVA, C. J.; ROBERTO, I. Fermentation performance of Candida guilliermondii for xylitol production on single and mixed substrate media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Paranaque, v. 72, n. 4, p. 681-686, 2006.

MUTREJA, R.; DAS, D.; GOYAL, D.; GOYAL, A. Bioconversion of agricultural waste to ethanol by SSF using recombinant cellulase from *Clostridium thermocellum*. **Enzyme research**, Cairo, v. 2011, n. 1, p. 1-6, maio 2011.

NAGAIAH, D.; CHIRANJEEVI, P.; RAO, S.; UMA, A.; PRAKASHAM, R. S. fermentation of pretreated high-biomass sorghum hydrolysates to biohydrogen by mixed consortia. **Sugar Tech**, Chennai, p. 1-7, 2015.

NIGAM, J. N. Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. **Journal of Applied Microbiology**, Paranaque, v. 90, n. 2, p. 208-215, 2001.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, Bielefeld, v. 87, n. 1, p. 17-27, abril 2001.

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

OH, Y. H.; EOM, I. Y.; JOO, J. C.; YU, J. H.; SONG, B. K.; LEE, S. H.; HONG, S. H.; PARK, S. J. Recent advances in development of biomass pretreatment technologies used in biorefinery for the production of bio-based fuels, chemicals and polymers. **Korean Journal of Chemical Engineering**, New York, v. 32, n. 10, p. 1945-1959, outubro 2015.

OLIVEIRA, F. M. V.; PINHEIRO, I. O.; SOUTO-MAIOR, A. M.; MARTIN, C.; GONÇALVES, A. R.; ROCHA, G. J. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresource Technology**, New York, v. 130, p. 168-173, fevereiro 2013.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 1, n. 7, dezembro 2008.

PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N. Q.; HAHN-HAGERDAL, B. Main and intercation effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, Malden, v. 63, n. 1, p. 46-55, abril 1999.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, New York, v. 74, n. 1, p. 25-33, agosto 2000.

PAPINI, M.; NOOKAEW, I.; UHIÉN, M.; NIELSEN, J. *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, Barcelona, v. 11, n. 136, 2012.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, New York, v. 65, n. 3, p. 191-201, setembro 1998.

102

PÉREZ, J.; MUNOZ-DORADO, J.; RUBIA, T. L.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, Heidelberg, v. 5, 2002.

PING, Y.; LING, H. Z.; SONG, G.; GE, J. P. Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by Candida tropicalis. **Biochemical Engineering Journal**, Evanston, v. 75, n. 15, p. 86-91, 2013.

PINHEIRO, A. D. T.; ROCHA, M. V.; MACEDO, G. R.; GONÇALVES, L. R. Evaluation of cashew apple juice for the production of fuel ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 148, n. 1, p. 227-234, março 2008.

PITARELO, A. P.; SILVA, T. A.; PERALTA-ZAMORA, G.; RAMOS, L. P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-deaçúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1502-1509, 2012.

POONSRISAWAT, A.; PHUENGJAYAEM, S.; PETSOM, A.; TEERADAKOM, S. Conversion of sweet sorghum straw to sugars by dilute acid saccharification. **Sugar Tech**, Chennai, v. 15, n. 13, p. 322-327, setembro 2013.

PU, Y.; HU, F.; HUANG, F.; DAVISON, B. H.; RAGAUSKAS, A. J. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 6, p. 6-15, 2013.

PUGAS, M. S. **Íons de metais pesados Ni, Cu e Cr em áreas impactada por resíduo de galvanoplastia na região metropolitana de São Paulo**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Recursos Minerais e Hidrogeologia, Universidade de São Paulo, Instituto de Geociências, 2007.

QI, W.; ZHANG, S. P.; XU, Q. L.; REN, Z. W.; YAN, Y. J. Degradation kinetics of xylose and glucose in hydrolysate containing dilute sulfuric acid. **The Chinese Journal of Process Engineering**, Hong Kong, v. 8, n. 6, p. 1132-1137, 2008.

RABELO, S. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. 2010. 83 f. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

RABELO, S. C.; ANDRADE, R. R.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, Londres, v. 136, p. 349-357, novembro 2014.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

REALES-ALFARO, J.-G.; DAZA, L. T. T.; LINDADO, G. A.; PELÁEZ, H. I C.; CÓRDOBA, A. D. P. Acid hydrolysis of water hyacinth to obtain fermentable sugars. **Ciencia, Tecnología y Futuro**, Piedecuesta, v. 5, n. 2, p. 101-111, novembro 2013.

REYES, P.; MENDONÇA, R. T.; RODRIGUEZ, J.; FARDIM, P.; VEGA, B. Characterization of the hemicellulosic fraction obtained after pre-hydrolysis of pinus radiata wood chips with hot-water at different initial pH. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Concepción, v. 58, n. 1, p. 1614-1618, 2013.

RFA, R. F. A.-. **World Fuel Ethanol Production**, 2015. Disponível em: <a href="http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/">http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/</a>. Acesso em: 12 nov. 2015.

RODRIGUES, T. H. S.; BARROS, E. M.; BRÍGIDO, J. S.; SILVA, W. M.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. The bioconversion of pretreated cashew apple bagasse into ethanol by SHF and SSF processes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, dezembro, 2015.

RODRIGUES, T. H. S. Estudo comparativo da produção de etanol por processos de SHF (fermentação e hidrólise separadas) e SSF (fermentação e hidrólise simultâneas) de bagaço de caju (*Anacordium occidentale* L.). 2014, 107 f. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, 2014.

RODRUSSAMEE, N.; LERTWATTANASAKUL, N.; HIRATA, K.; SUPRAYOGI; LIMTONG, S.; KOSAKA, T.; YAMADA, M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Paranaque, v. 90, n. 4, p. 1573-1586, maio 2011.

ROUHOLLAH, H.; IRAJ, N.; GITI, E.; SORAH, A. Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Sacharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cocultures. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 6, n. 9, p. 1110-1114, 2007.

RUAN, Z.; HOLLINSHEAD, W.; ISAQUIRRE, C.; TANG, Y. J.; LIAO, W.; LIU, Y. Effects of inhibitory compounds in lignocellulosic hydrolysates on Mortierella isabellina growth and carbon utilization. **Bioresource Technology**, New York, v. 183, p. 18-24, maio 2015.

RUIZ, H. A.; SILVA, D. P; RUZENE, D. S.; LIMA, L.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating Saccharomyces cerevisiae strain – effect of process conditions. **Fuel**, Londres, v. 95, p. 528-536, 2012.

SAHA, B. C.; NICHOLS, N. N.; QURESHI, N.; KENNEDY, G. J.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A. Pilot scale conversion of wheat straw to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, New York, v. 175, p. 17-22, 2015.

SAINI, J. K.; AGRAWAL, R.; SATIEWAL, A.; SAINI, R.; GUPTA, R.; MATHUR, A.; TULI, D. Second generation bioethanol production at high gravity of pilot-scale pretreated wheat straw employing newly isolated thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DBTIOC-35. **RSC Advances**, Texas, v. 5, p. 37485-37494, 2015.

SAITO, I. M.; CABELLO, C. Produção de etanol a partir do hidrolisado obtido por tratamento hidrotérmico de farelo de mandioca. **Energia Agrícola**, Botucatu, v. 21, n. 3, p. 34-44, 2006.

SANCHEZ, G.; PILCHER, L.; ROSLANDER, C.; MODIG, T.; GALBE, M.; LIDÉN, G. Diluteacid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava. **Bioresource Technology**, New York, v. 93, n. 3, p. 249-256, julho 2004.

SÁNCHEZ, Ò. J.; CARDONA, C. A. Conceptual design of cost-effective and environmentallyfriendly configurations for fuel ethanol production from sugarcane by knowledge-based process synthesis. **Bioresource Technology**, New York, v. 104, p. 305-314, janeiro 2012.

SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V; CASTRO, E.; MOYA, A. J.; CAMACHO, F. The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Malden, v. 77, p. 641-648, 2002.

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

SANTOS, R. F.; PLACIDO, H. F.; GARCIA, E. B.; CANTU, C.; ALBRECHT, A. J. P.; ALBRECHT, L. P.; FRIGO, K. D. A. Sorgo sacarino na produção de agroenergia. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, Palotina, v. 4, p. 1-12, 2015.

SARAÇOGLU, N. E.; ÇAVUSOGLU, H. Fermentative performance of *Candida tropicalis* Kuen 1022 yeast for d-xylose and sunflower seed hull hydrolysate in xylitol production. **Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences**, Turkish, v. 23, p. 433-438, 1999.

SCORDIA, D; CONSENTINO, S. L.; LEE, J. W.; JEFFRIES, T. W. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054. **Biomass and Bioenergy**, Aberdeen, v. 39, p. 296-305, 2012.

SENE, L.; ARRUDA, P. V.; OLIVEIRA, S. M. M.; FELIPE, M. G. A. Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 1141-1146, julho-setembro 2011.

SHI, N.-Q.; CRUZ, J.; SHERMAN, F.; JEFFRIES, T. W. SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipits*. **Yeast**, Malden, v. 19, p. 1203-1220, 2002.

SILVA, D. D. V.; ARRUDA, P. V.; DUSSÁN, K. J.; FELIPE, M. G. A. Adaptation of *Scheffersomyces stipitis* cells as a strategy to the improvement of ethanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Chemical Engineering Transactions**, Milano, v. 38, p. 427-431, 2014.

SILVA, D. D. V.; ARRUDA, P. V.; VICENTE, F. M. C. F.; SENE, L.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Evaluation of fermentative potential of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in cellulosic and hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysates on xylitol and ethanol production. **Annals of Microbiology**, Paranaque, v. 65, n. 2, p. 687-694, junho 2014.

SILVA, D. D. V.; CÂNDIDO, E.; ARRUDA, P. V.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. D. New cultive medium for bioconversion of C5 fraction from sugarcane bagasse using rice bran extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 14-69-1475, outubro-dezembro 2014.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 1, p. 28, janeiro/março 2011.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, Lemesos, v. 37, n. 1, p. 259-265, janeiro 2012.

SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C. Treatment of rice straw hemicellulosic hydrolysates with advanced oxidative processes: a new and promising detoxification method to improve the bioconversion process. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 6, n. 23, 2013.

SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C. Assessment of advanced oxidative processes based on heterogeneous catalysis as a detoxification method of rice straw

hemicellulose hydrolysate and their effect on ethanol production by *Pichia stipitis*. **Biomass Conversion and Biorefinery**, Heidelberg, v. 4, n. 3, p. 225-236, 2014.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 162, n. 5, p. 1306-1315, novembro 2010.

SILVA, N. L. C.; BETANCUR, G. J.; VASQUEZ, M. P.; GOMES, E. B.; PEREIRA JR, N. Ethanol production from residual wood chips of cellulose industry: acid pretreatment investigation, hemicellulosic hydrolysate fermentation, and remaining solid fraction fermentation by SSF process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 163, n. 7, p. 928-936, abril 2011.

SINGH, L. K.; CHAUDHARY, G.; MAJUMDER, C. B.; GHOSH, S. Utilization of hemicellulosic fraction of lignocellulosic biomaterial for boethanol production. **Advances in Applied Science Research**, Coden, v. 2, n. 5, p. 508-521, outubro 2011.

SINGH, M. P.; ERICKSON, J. E.; SOLLENDERGER, L. E.; WOODARD, K. R.; VENDRAMINI, J. M. B.; FEDENKO, J. R. Mineral composition and biomass partitioning of sweet sorghum grown for bioenergy in the southeastern USA. **Biomass and Bioenergy**, Aberdeen, v. 47, p. 1-8, dezembro 2012.

SINGHANIA, R. R.; SAINI, J. K.; SAINI, R.; ADSUL, M.; MATHUR, A.; GUPTA, R.; TULI, D. K. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. **Bioresource Technology**, New York, v. 169, p. 490-495, 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELARAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 199, p. 152-178, 1999.

SKOOG, K.; HAHN-HAGERDAL, B.; DEGN, H.; JACOBSEN, J. P.; JACOBSEN, H. S. Ethanol reassimilation and ethanol tolerance in *Pichia stipitis* CBS 6054 as studied by C nuclear magnetic resonance Spectroscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 8, p. 2552-2558, 1992.

SLININGER, P. J.; BOTHAST, R. J.; LADISCH, M. R.; OKOS, M. R.Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, Malden, v. 35, n. 7, março, 1990.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. **Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL**, p. 9, 2008a.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of extractives in biomass in biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL,** p. 12, 2008b. ISSN Report No. TP-510-42619.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL**, p. 18c, 2008c. ISSN Report No. TP-510-42618.

SOFIA, D.; JOSHI, Y. A.; POLETTO, M. Kinetics of bioethanol production from lactose converted by *Kluyveromyces marxianus*. **Chemical Engineering transactions**, Milano, v. 32, p. 1135-1140, 2013.

SOUZA, W. R. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. In: CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization. [S.I.]: InTech, 2013. cap. 9, p. 284.

SRINORAKUTARA, T.; SUTTIKUL, S.; BUTIVATE, E.; PANPHAN, V.; BOONVITTHYA, N. Optimization on pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane trash for ethanol production. **Journal of Food Science and Engineering**, Dordrecht, v. 4, p. 148-154, 2014.

STATSOFT. STATSOFT. Statistica for Windows (Data analysis Software System), Tulsa, 2005.

STOUTENBURG, R. M.; PERROTTA, J. A.; AMIDON, T. E.; NAKAS, J. P. Ethanol production from a membrane purified hemicellulosic hydrolysate derived from sugar maple by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Bioresources**, New York, v. 3, n. 4, p. 13-49-1358, 2008.

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Intensification of enzymatic hydrolysis of lignocellulose using ultrasound for efficient bioethanol production: a review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Pensilvania, v. 52, n. 34, p. 11816-11828, 2013.

SUN, Y.; CHENG, J. Enzymatic hydrolysis of rye straw and bermudagrass using cellulases supplemented with  $\beta$ -glicosidase. **Journal Transactions of the ASAE**, Saint Joseph, v. 47, n. 1, p. 343-349, 2004.

SURYAWATI, L.; WILKINS, M. R.; BELLMER, D. D.; HUHNKE, R. L.; MANESS, N. O.; BANAT, I. M. Simultaneous saccharification and fermentation of kanlow switchgrass pretreated by hydrothermolysis using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. **Biotechnology and Bioengineering**, Malden, v. 101, n. 5, p. 894-902, 2008.

SWAMINATHAN, J.; JAYAPAL, P. R.; ASOKAN, M.; RAMASAMY, D. Dilute acid pretreatment of Sweet sorghum stalk and its characterization. International Journal of ChemTech Research, Coden, v. 8, n. 6, p. 589-598, 2015.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Physiological effects of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Paranaque. v. 53, n. 6, p. 701-708, junho 2000.

TAVARES, B. Estudo das condições de cultivo e adaptação do inóculo de *Pichia stipitis* ATCC 58376 para produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agricola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2013.

TOMAS-PEJO, E.; GARCÍA-APARICIO, M; NEGRO, M. J.; DOMINGUEZ, J. M. O.; BALLESTEROS, M. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. **Bioresource Technology**, New York, v. 100, n. 2, p. 890-895, Agosto 2008.

UNREAN, P.; NGUYEN, N. H. A. Rational optimization of culture conditions for the most efficient ethanol production in *Scheffersomyces stipitis* using design of experiments. **Biotechnology Progress**, Malden, v. 28, n. 5, p. 1119-1125, setembro 2012.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N.; SOUZA, M. B. J.; PEREIRA, N Jr. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 137-140, n. 1, p. 141-153, abril 2007.

VRIESEKOOP, F.; HAASS, C.; PAMMENT, N. B. The role of acetaldehyde and glycerol in the adaptation to ethanol stress of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts. **FEMS Yeast Research**, Singapura, v. 9, n. 3, p. 365-371, maio 2009.

WANDERLEY, M. C. A.; SOARES, M. L.; GOUVEIA, E. R. Selection of inoculum size and *Saccharomyces cerevisiae* strain for ethanol production in simultaneous sacarification and fermentation (SSF). **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 13, n. 27, p. 2762-2765, julho 2014.

WANG, K.; YANG, H.; CHEN, Q.; SUN, R. C. Influence of delignification efficiency with alkaline peroxide on the digestibility of furfural residues for bioethanol production. **Bioresource Technology**, New York, v. 146, p. 208-214, 2013.

WANG, M.; HAN, J.; DUNN, J. B.; CAI, H.; ELGOWAINY, A. Well-to-wheels energy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn, sugarcane and cellulosic biomass for US use. **Environmental Research Letters**, Califórnia, v. 7, p. 1-13, 2012.

WANG, Z.; KESHAWANI, D. R.; RADDING, A. P.; CHENG, J. J. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 10, p. 3583-3585, 2010.

WI, S. G.; CHOI, I. S.; KIM, K. H.; KIM, H. M.; BAE, H. J. Bioethanol production from rice straw by popping pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 6, n. 166, 2013.

WIKANDARI, R.; MILLATI, R.; SYAMSIYAH, S.; MURIANA, R.; AYUNINGSHIH, Y. Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on indigeneous microbial isolate for bioethanol production. **Agricultural Journal**, v. 5, n. 2, p. 105-109, 2010.

WONG, D. W. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New york, v. 157, n. 2, p. 174-209, 2009.

WU, X.; STAGGENBORG, S.; PROPHETER, J. L.; ROONEY, W. L.; YU, J.; WANG, D. Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation. **Industrial Crops and Products**, Philadelphia, v. 31, n. 1, p. 164-170, 2010.

XIE, J.; WENG, Q.; YE, G.; LUO, S.; ZHU, R.; ZHANG, A.; CHEN, X.; LIN, C. Bioethanol production from sugarcane grown in heavy metal-contaminated soils. **Bioresources**, New York, v. 9, n. 2, p. 2509-2520, 2014.

XU, J.; CHEN, Y.; CHENG, J. J.; SHARMA-SHIVAPPA, R.; BURNS, J. Delignification of switchgrass cultivars for bioethanol production. **BioResources**, New York, v. 6, n. 1, p. 707-720, 2011.

YABEFA, J. A.; OCHOLI, Y.; ODUBO, G. F. Effect of temperature and changes in medium pH on enzymatic hydrolysis of  $\beta(1-4)$  glycosidic bond in orange mesocarp. Asian Journal of **Plant Science and Research**, Coden, v. 4, n. 4, p. 21-24, 2014.

YABLOCHKOVA, E. N.; BOLOTNIKOVA, O. I.; MIKHAILOVA, N. P.; NEMOVA, N. N.; GINAK, A. I. The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. **Microbiology**, Chennai, v. 72, n. 4, p. 414-417, julho 2003.

YAH, C. S.; IYUKE, S. E.; UNUABONAH, E. I.; PILLAY, O.; VISHANT, CH.; TESSA, S. M. Temperature optimization for bioethanol production from corn cobs using mixed yeast strains. **OnLine Journal of Biological Sciences**, Chennai, v. 10, n. 2, p. 103-108, 2010.

YLITERVO, P.; FRANZÉN, C. J.; TAHERZADEH, M. J. Continuous ethanol production with a membrane bioreactor at high acetic acid concentrations. **Membranes**, Pensilvânia, v. 4, n. 3, p. 372-387, Setembro 2014.

YU, J.; ZHANG, T.; ZHONG, J.; ZHANG, X.; TAN, T. Biorefinery of sweet sorghum stem. **Biotechnology Advances**, Philadelphia, v. 30, n. 4, p. 811-816, 2012.

ZAK, D. R.; BLACKWOOD, C. B.; WALDROP, M. P. A molecular dawn for biogeochemistry. **Trends in Ecology & Evolution**, Londres, v. 21, n. 6, p. 288-295, 2006.

ZHA, Y.; WESTERHUIS, J. A.; MUILWIJK, B.; OVERKAMP, K. M.; NIJEMEIJER, B. M.; COULIER, L.; SMILDE, A. K.; PUNT, P. J. Identifying inhibitory compounds in lignocellulosic biomass hydrolysates using an exometabolomics approach. **BMC Biotechnology**, Lodnres, v. 14, n. 22, p. 1-16, 2014.

ZHANG, W.; MOU, H.; CUI, H.; ZHANG, Y. Isolation of xylose fermentation strains for ethanol production and xylose *fermentation* research. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Switzerland, v. 28, n. 1, p. 117-124, 2014.

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

ZHU, J.; YANG, J.; ZHU, Y.; ZHANG, L.; YONG, Q.; XU, Y.; LI, X.; YU, S. Cause analysis of the effects of acid-catalyzed steam-exploded corn stover prehydrolyzate on ethanol fermentation by *Pichia stipitis* CBS 5776. **Bioprocess & Biosystems Engineering**, Heidelberg, v. 37, n. 11, p. 2215-2222, Novembro 2014.

### 9 APÊNDICE I

#### 9.1 Determinação do teor de cinzas Totais

Para a quantificação das cinzas totais, os cadinhos de porcelana foram padronizados em forno mufla a 575 °C durante quatro horas. Após esse tempo os mesmos foram resfriados em dessecador por uma hora, seguido de pesagem. Nos cadinhos foram acondicionados 2 g de amostra seca e em seguida voltaram para a mufla a 575 °C por aproximadamente 3 horas. Após esse tempo, os cadinhos foram retirados, resfriados à temperatura ambiente em dessecador e posteriormente pesados para determinação da massa de cinzas através da Equação 15:

% Cinzas=
$$\left(\frac{M_{C+C}-M_{C}}{M_{a}}\right)$$
\*100 Equação 15

onde:

 $M_{C+C}$  - Massa do cadinho com cinzas (g);  $M_c$  - Massa do cadinho vazio (g);  $M_a$  - Massa da amostra seca (g).

#### 9.2 Determinação do teor de umidade

A quantidade de umidade presente na biomassa do sorgo sacarino foi determinada através da metodologia "Determination of Total Solids in Biomass" do NREL (SLUITER et al., 2008a), na qual 6 g da amostra de bagaço do sorgo foram adicionados em béqueres de 100 mL e secos em estufa a 105 °C até peso constante. Foram obtidas as massas dos béqueres vazios previamente secos e da amostra antes e após a secagem. Os resultados das pesagens foram utilizados conforme a Equação 16 para obtenção do teor de umidade:

% umidade= 
$$\left[1 - \left(\frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1}\right)\right] * 100$$
 Equação 16

Onde:

M<sub>1</sub> - Massa do béquer vazio (g);

M2 - Massa do béquer com amostra úmida (g);

M<sub>3</sub> - Massa do béquer com amostra seca (g).

#### 9.3 Determinação de extrativos na biomassa

Para a quantificação de extrativos na biomassa foi utilizado o procedimento "Determination of Extractives in Biomass" (SLUITER et al., 2005b) do NREL. Para isso, 4 g da amostra em base seca foram acondicionados em envelopes de papel de filtro e extraídos em aparelho de Soxhlet com éter de petróleo, seguida da evaporação do solvente em estufa a 105 °C até obtenção de massa constante. Para obtenção do teor de extrativo do bagaço foi utilizada a Equação 17:

% extrativos: 
$$\left(\frac{M_{a}-M_{b}}{M_{a}}\right)$$
\*100

Equação 17

Onde:

M<sub>a</sub> - Massa do bagaço em base seca (g);

M<sub>b</sub> - Massa do bagaço livre de extrativos (g).

# 9.4 Determinação de celulose, hemicelulose e lignina

Para determinação da composição química quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina, foi emprege a metodologia "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass" (SLUITER et al., 2008c) do NREL.

Após a pesagem de 0,30 g de bagaço de sorgo em base seca, a amostra foi transferida para tubo de ensaio, no qual foram acrescentados 3 mL de ácido sulfúrico a 72% m/v. Em seguida, a mistura foi homogenizada durante 1 minuto e incubada em banho termostático a 30 °C por 60 minutos, sendo que a cada 10 minutos foi feita a agitação com bastão de vidro, a fim uniformizar o meio.

Ao concluir os 60 minutos, os tubos foram removidos do banho termostático e o conteúdo transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL e adicionados 84 mL de água destilada. Os frascos Erlenmeyer, após fechamento com papel alumínio, foram autoclavados a 121 °C por 60 minutos. Após a descompressão e retirada da autoclave, os frascos Erlenmeyer foram resfriados à temperatura ambiente e em seguida o conteúdo foi filtrado utilizando papel filtro.

Após a filtragem, cerca de 50 mL do hidrolisado foram armazenados em freezer para determinação da lignina solúvel, açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose), ácido acético, fenóis, furfural e hidroximetilfurfural.

Os sólidos que ficaram retidos no papel filtro, provenientes da fase de hidrólise ácida da caracterização química, passaram por lavagem com aproximadamente 1,5 L de água destilada para remoção de ácido residual e foram submetidos à secagem em estufa a 105 °C até peso constante, para determinação da sua massa.

Após a determinação do teor de lignina insolúvel, os resíduos foram transferidos para cadinhos de porcelana para determinação da massa de cinzas, conforme metodologia descrita para determinação de cinzas totais. Os resultados obtidos de cinzas foram utilizados para descontar o teor de lignina, descrito no item lignina insolúvel, obtendo-se então o valor real de lignina insolúvel.

Para determinação da porcentagem de lignina foi utilizada a Equação 18.

$$L_{ki} = \frac{(M_{p+a} - M_{p}) - (M_{C+C} - M_{C})}{M_{a}} *100$$
 Equação 18

Onde:

Lki - Lignina Klason insolúvel (%);

M<sub>p+a</sub> - Peso papel filtro com amostra seca (g);

M<sub>p</sub> - Peso papel filtro (g);

M<sub>C+C</sub> - Massa do cadinho com cinzas da lignina (g);

M<sub>c</sub> - Massa do cadinho vazio (g);

M<sub>a</sub> - Massa da amostra seca (g).

### 9.4.2 Lignina solúvel

Para a quantificação da lignina solúvel, alíquotas de 1 mL dos hidrolisados foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL, que tiveram seus volumes aferidos com água destilada. A leitura foi realizada a 280 nm em espectrofotômetro. A concentração de lignina solúvel foi obtida a partir das Equações 20 e 21.

$$Lig_{sol} = (41,87*(A_T - A_{pd}) - 0,3279)*10^{-3}$$
 Equação 20

$$\% \text{Lig}_{\text{sol}} = \left[\frac{C_{\text{lignina solúvel}} * V_{\text{filtrado}} * \text{FD}}{M_{1}}\right] * 100$$
Equação 21

Onde:

 $A_{\text{T}}$  - Absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação a 280 nm;

 $A_{pd}$ : = c1 ɛ1 + c2 ɛ2 - absorbância a 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações c1 e c2 foram determinadas antecipadamente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e ɛ1 e ɛ2 são as absortividades, as quais valem respectivamente, 146,85 e 114,00 L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>;

C<sub>lignina solúvel</sub> - Concentração da lignina solúvel obtido através da Equação, em g.L<sup>-1</sup>;

V<sub>filtrado</sub> - Volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L;

FD - Fator de diluição para leitura da absorbância, 100;

M1 - Massa do bagaço utilizando na hidrólise descontado o teor de umidade (g).

# 9.4.3 Lignina total:

O resultado da lignina insolúvel e solúvel foi utilizada para deteminar a quantidade de lignina total.

% Lignina total=% Lignina insolúvel+% lignina solúvel

# 9.4.4 Celulose e hemicelulose

Para determinação do teor celulose e hemicelulose, 20 mL do licor obtido a partir da hidrólise foi transferido para um Erlenmeyer de 50 mL. Em seguida foi adicionado, lentamente, carbonato de cálcio até pH 5. Após decantação, uma alíquota do sobrenadante foi retirada, filtrada em "Sep Pak" C18 e analisada em HPLC e determinada a concentração de açúcares, conforme as condições descritas no métodos para determinação de açúcar.

A porcentagem de hemicelulose e celulose foram obtidas a partir da concentração de açúcares monoméricos conforme Equação 22.

% de açúcares= 
$$\left[\frac{C_{CLAE} * CA*V_{filtrado}}{M1}\right] * 100$$
 Equação 22

## Onde:

C<sub>CLAE</sub> - Concentração do açúcar quantificado por CLAE, em g.L<sup>-1</sup>;

CA - Anidro correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares. Para a glicose, celobiose, xilose e arabinose temos: 0,90; 0,95; 0,88 e 0,88, respectivamente;

V<sub>filtrado</sub> - Volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L;

M<sub>1</sub> - Massa do bagaço utilizado na hidrólise.