

Universidade de Brasília

Instituto de Química



**Fatores que Influenciam na
Fermentação Etanólica do Hidrolisado
de *Eucalyptus urophylla***

Sumara Teixeira Alves

Orientador: Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto

Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves

Brasília, Março de 2014

Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação Em Química



**Fatores que Influenciam na
Fermentação Etanólica do Hidrolisado
de *Eucalyptus urophylla***

Sumara Teixeira Alves

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Química como pré-
requisito para obtenção do
título de Mestre.

Brasília, Março de 2014

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me ama incondicionalmente.
E a todos que contribuíram para sua realização e conclusão.

Agradecimentos

Ao meu Senhor e Salvador, Jesus Cristo, por estar comigo em todos os momentos que passei, tanto os difíceis como os mais alegres, e por me orientar e me guiar em todos os passos e decisões. Obrigado Senhor.

A Universidade de Brasília, ao Instituto de Química e a Unidade Embrapa Agroenergia, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto, pela orientação, por ter acreditado em mim e pela oportunidade que me concedeu em ser coorientada pela Dra. Sílvia Belém Gonçalves.

A Pesquisadora Dra. Sílvia Belém Gonçalves, pela dedicação, atenção, carinho, correções, pelos ensinamentos que me passou e principalmente pela amizade. Muito obrigada.

As analistas do laboratório, Thályta, Thais e Carolina, pela disposição em ajudar sempre que foi preciso.

Aos meus pais, David e Alaydes, por terem me ensinado a andar no caminho do Senhor e me proporcionado as melhores opções de ensino e condições de vida.

Ao meu marido e amigo, André, pela compreensão pela ausência, paciência, carinho, pelo grande amor e por muitas vezes me escutar sem entender muita coisa.

As minhas queridas irmãs e irmão, e seus cônjuges, pelas orações, força, apoio, incentivo e compreensão por muitas vezes estar ausente.

A minha querida amiga e discipuladora, Zenaide, pelo companheirismo, pelas orações, pelos jejuns, por me incentivar e nunca deixar desanimar e pelo amor de mãe.

Aos queridos irmãos em Cristo, da Célula, e da Igreja, pelas orações, carinho, preocupação, e por torcerem pelo meu sucesso.

A Gisele e Gabriella, amigas do Mestrado em Química, pela disposição em ajuda sempre que tive necessidade, pela paciência e incentivo.

A todos os meus amigos, que torceram por mim, pelo grande apoio e aqueles que contribuíram mesmo não sendo citados para o meu crescimento profissional e pessoal.

Sumário

Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Sumário	v
Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Abreviações e Acrônimos	x
Lista de Figuras	xi
1-Introdução	1
1.1 <i>Produção de Bioetanol de materiais lignocelulósicos</i>	3
1.2 <i>A madeira</i>	4
1.3 <i>Resíduos gerados pelo uso da madeira</i>	5
1.4 <i>O material lignocelulósico</i>	5
1.4.1 <i>Celulose</i>	6
1.4.2 <i>Hemicelulose</i>	6
1.4.3 <i>Lignina</i>	7
1.5 <i>Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos</i>	8
1.5.1 <i>Pré-tratamentos</i>	9
1.5.2 <i>Hidrólise</i>	11
1.5.2.1 <i>Hidrólise enzimática</i>	11
1.5.2.2 <i>Hidrólise química</i>	12
1.5.3 <i>Fermentação</i>	13
1.5.3.1 <i>O microrganismo da fermentação</i>	14
1.5.3.2 <i>Os inibidores da fermentação</i>	15
2 - Objetivos	17
2.1. –Objetivos Gerais.....	17
2.2 –Objetivos Específicos	17
3. Materiais e métodos	18

3.1	3.1	18
3.1.1	3.1.1	18
3.2	3.2	19
3.2.1	3.2.1	19
3.2.2	3.2.2	19
3.2.2.1	3.2.2.1	19
3.2.2.2	3.2.2.2	19
3.2.3	3.2.3	20
3.2.4	3.2.4	21
3.2.5	3.2.5	22
3.2.5.1	3.2.5.1	22
3.2.5.2	3.2.5.2	22
3.2.5.3.1	3.2.5.3.1	23
3.2.5.4	3.2.5.4	25
3.2.5.5	3.2.5.5	25
3.2.5.6	3.2.5.6	26
3.2.5.7	3.2.5.7	26
3.2.6	3.2.6	27
3.2.6.1	3.2.6.1	27
3.2.6.2	3.2.6.2	27
3.2.6.3	3.2.6.3	27
3.2.6.4	3.2.6.4	28
4	4 – Resultados e Discussão	29
4.1	4.1	29
4.1.1	4.1.1	29
4.1.2	4.1.2	30
4.2	4.2	31
4.3	4.3	32
4.3.1	4.3.1	33
4.3.2	4.3.2	34
4.3.2.1	4.3.2.1	34
4.3.2.2	4.3.2.2	35
4.3.2.3	4.3.2.3	38
4.3.2.4	4.3.2.4	39
4.3.3	4.3.3	41
4.3.3.1	4.3.3.1	41
4.3.3.2	4.3.3.2	42
4.3.3.3	4.3.3.3	43

4.3.3.4 Meio hidrolisado suplementado	45
5 – Conclusões e Perspectivas	47
Referências	49

Resumo

Na busca de novas tecnologias, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas visando à produção de energias mais limpas. Uma das fontes de energias renováveis mais pesquisadas são os resíduos de biomassas lignocelulósicas, como a madeira de eucalipto, que fornecem materiais como celulose, hemicelulose e lignina, para a produção de biocombustíveis, como briquetes e etanol. A biomassa estudada foi o eucalipto da espécie *Eucalyptus urophylla*. O processo de conversão destes materiais a etanol é separado em três etapas – pré-tratamento – hidrólise – fermentação. O pré-tratamento foi realizado em duas etapas a primeira foi ácida com 1,5 % de H_2SO_4 e a segunda etapa foi alcalina com 4% de NaOH. Em seguida foi realizada a etapa de hidrólise enzimática. Na etapa de fermentação foi analisado o comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é largamente utilizada no processo de fermentação. O pré-tratamento tem o objetivo de disponibilizar a celulose presente na biomassa e a hidrólise enzimática de quebrar esta celulose em glicose. Durante os procedimentos de pré-tratamento há a formação de compostos inibidores que podem interferir na fermentação, sendo o rendimento do etanol comprometido. Estes produtos são os derivados do furano, como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural, os ácidos alifáticos, como o ácido acético, e os derivados fenólicos. O foco deste trabalho é avaliar a produção de etanol a partir da celulose resultante das etapas citadas acima. Na fermentação do meio hidrolisado a levedura não se desenvolveu completamente e a produção de etanol não foi eficiente. Com isso, foram analisados diferentes meios de fermentação e foi constatado que além da presença de inibidores no meio hidrolisado, há a falta de nutrientes para o crescimento do microrganismo, pois a levedura obteve resultados opostos quando analisado o meio sintético contendo inibidores e o meio hidrolisado suplementado com sais minerais.

Abstract

In search of new technologies, many researches are being developed aiming at the production of cleaner energy. One of the most researched sources of renewable energy is waste from lignocellulosic biomass such as eucalyptus wood, providing materials such as cellulose, hemicellulose and lignin for the production of biofuels such as ethanol and briquettes. His biomass was studied eucalypt species *Eucalyptus urophylla*. The process of conversion of these materials to ethanol is separated into three phases – pre-treatment – Hydrolysis – Fermentation. The pre-treatment was performed in two stages with the first acid was 1.5% H₂SO₄ and the second stage was alkaline with 4% NaOH. After the enzymatic hydrolysis step was carried out. In the fermentation step was analyzed the behavior of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is widely used in the fermentation process. Pretreatment aims to provide this in biomass and enzymatic hydrolysis of cellulose into glucose break this pulp. During the following pre-treatment for the formation of inhibitory compounds that can interfere with the fermentation, and the yield of ethanol compromised. These products are furan derivatives such as furfural and 5-hydroxymethylfurfural, aliphatic acids such as acetic acid and phenolic derivatives. The focus of this study is to evaluate the production of ethanol from cellulose resulting from the steps mentioned above. In the fermentation of yeast hydrolysate medium not fully developed and ethanol production was inefficient. Thus, different fermentation media was analyzed and consisted that in addition to the presence of inhibitors in the hydrolyzate environment, there is a lack of nutrients for growth of the microorganism, as opposed to yeast results obtained when analyzing the synthetic medium containing inhibitors and the hydrolyzate medium supplemented mineral salts.

Lista de Abreviações e Acrônimos

Absorbância	ABS
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido ribonucleico	RNA
Adenosina trifosfato	ATP
Agência Internacional de Energia	AIE
Ammonia fiber expansion	AFEX
Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência	CLAE
Densidade ótica	DO
Dióxido de carbono	CO ₂
Eficiência de fermentação	E
Eucalyptus urophylla	EU
Extrato de levedura, Peptona bacteriológica, Glicose	YPG
Fator de conversão de substrato em células	Y _{X/S}
Fator de conversão de substrato em produto	Y _{P/S}
Hidroximetilfurfural	HMF
Nicotinamida adenina dinucleotídeo	NAD ⁺
Saccharomyces cerevisiae	S. cerevisiae
Taxa específica de crescimento celular	μ _{max}
Filter Paper of Unit	FPU

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da molécula de celulose. (adaptada da ref. 2).	6
Figura 2 - Representação esquemática da hemicelulose. (adaptada de ref. 2).....	7
Figura 3 - Representação esquemática da lignina de eucalipto. (adaptada de ref. 2)..	8
Figura 4 - Alterações estruturais do complexo celulose - hemicelulose - lignina determinadas pelo pré-tratamento. (adaptada da ref. 2)	9
Figura 5 - Hidrólise da celulose. (adaptada da ref. 33).....	11
Figura 6 - Imagem da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ⁴⁴	15
Figura 7 - Hidrólise enzimática após 24 horas de incubação.	22
Figura 8 - Ilustração da técnica de esgotamento de cultura em placa de Petri com meio sólido.3.2.5.3 Dosagem de células	23
Figura 9 - Fermentação do meio hidrolisado com suplemento e meio sintético como contraprova.	26
Figura 10 - Amostras de eucalipto EU: (A) eucalipto em seu estado bruto; (B) eucalipto após pré-tratamento ácido; (C) eucalipto após pré-tratamento ácido e seguido do alcalino.....	31
Figura 11 - Equação da reta gerada pela curva padrão. Sendo y a concentração desejada e ABS a absorbância.	33
Figura 12 - Crescimento da levedura em meio sintético.....	35
Figura 13 - Crescimento da levedura no meio hidrolisado.....	36
Figura 14 - Cromatograma do tempo final da fermentação do meio hidrolisado sem diluição realizado no CLAE.	37
Figura 15 - Crescimento da levedura em meio sintético na presença dos compostos furfural e HMF.	38
Figura 16 - Crescimento da levedura no meio hidrolisado suplementado com sais inorgânicos.....	40
Figura 17 - Consumo de glicose e produção de etanol no meio sintético.	42
Figura 18 - Consumo de glicose e formação de etanol no meio hidrolisado.	43
Figura 19 - Consumo de glicose e produção de etanol no meio sintético na presença de inibidores.	44

Figura 20 - Consumo de glicose e produção de etanol no meio hidrolisado
suplementado.....46

1-Introdução

As mudanças climáticas e a elevação nos custos dos combustíveis provenientes do petróleo aliadas às estratégias de produção de energia têm motivado uma corrida no desenvolvimento da produção de biocombustíveis de fontes renováveis, sendo uma das fontes a biomassa lignocelulósica.¹

O grande desafio para a produção de biocombustíveis, derivados de biomassas lignocelulósicas, esta em escolher a melhor alternativa que disponibilize a glicose, a partir da hidrólise da celulose, visando o rendimento e a fermentabilidade do hidrolisado.¹ Neste sentido, há um grande estímulo da sociedade científica em estudar a matriz energética. Um exemplo é o desenvolvimento de novos processos economicamente viáveis para o aproveitamento de biomassas lignocelulósicas.²

O etanol vem sendo utilizado em larga escala no Brasil, contudo nos Estados Unidos e em alguns países da Europa têm sido utilizado fundamentalmente como aditivos aos combustíveis de origem fósseis, e é considerado um dos biocombustíveis renováveis mais promissores no setor de transporte nos próximos 20 anos.¹

A madeira é a mais antiga fonte de energia que se tem conhecimento e desde a antiguidade é utilizada como combustível. Como fonte energética, a madeira é denominada lenha e foi a primeira fonte de energia usada pelo homem para a obtenção de fogo.³ Sendo um grande contribuinte para o desenvolvimento da humanidade, a madeira passou a ser utilizada como combustível sólido, líquido e gasoso, em processos para a geração de energia térmica, mecânica e elétrica.⁴

O uso da madeira na indústria, tanto primário como secundário gera uma grande quantidade de resíduos. A quantidade de resíduos de madeira gerada no meio urbano (entulhos da construção civil, poda de árvores, embalagens, entre outros), também é considerável. São geradas no Brasil, anualmente, cerca de 30.603 de toneladas de resíduos de madeira. Porém, somente uma pequena parte destes resíduos tem algum aproveitamento econômico, social e/ou ambiental.⁵

No Brasil, a lenha usada como fonte de energia ocupa o terceiro lugar. Ela é aproveitada de duas maneiras diferentes: (1) combustão direta, que é o processo mais antigo para a produção de calor doméstico e industrial; e (2) pirólise, que é o processo da decomposição térmica da madeira na ausência de ar.⁶

Uma forma de aproveitamento do resíduo da madeira é o briquete, a lenha

ecológica ou serragem prensada, que é feita pelo processo de densificação dos resíduos madeireiros, sendo muito utilizada na geração de energia calorífica em estufas, caldeiras, fogões com alimentação automática, nas indústrias, bem como na manutenção do fogo em lareiras, grelhas e churrasqueiras, nas residências, etc.⁷

A conversão de material lignocelulósico, como os resíduos de madeira, em açúcar fermentáveis vem sendo considerada uma alternativa promissora para aumentar a produção de etanol.⁸ A utilização de materiais lignocelulósicos para produzir etanol envolve quatro etapas: pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação, e destilação.⁹

Existem vários pré-tratamentos sendo estudados e analisados para a obtenção de etanol proveniente da biomassa lignocelulósica. Contudo, o foco deste trabalho foi analisar o comportamento do microrganismo no processo fermentativo em diferentes meios de fermentação. O meio que foi usado como padrão foi o meio sintético, um meio rico para o desenvolvimento da levedura, e o meio analisado foi o hidrolisado do resíduo da madeira de *Eucalyptus urophylla* – EU, fornecida pela unidade da Embrapa Floresta foi cultivada na região entre Ponta Porã – MS e Dourados – MS, localizada em Colombo, distrito de Curitiba - PR

Na etapa da fermentação a levedura mais usada é a *Saccharomyces cerevisiae*, e devido à sua capacidade fermentativa é usada na produção industrial de cervejas, vinhos, aguardentes e outras bebidas fermentadas. É o principal microrganismo utilizado na produção de álcool combustível.¹⁰ Porém, sua atuação na fermentação de hidrolisados derivados da biomassa lignocelulósica tem sido alterada pela presença de inibidores, levando a baixos rendimentos.

Neste sentido, o presente trabalho foi dividido em três etapas: a etapa do pré-tratamento, a etapa da hidrólise enzimática e a etapa da fermentação. Na etapa da fermentação foram analisados o desenvolvimento da levedura quanto ao seu crescimento e seu desempenho em produzir etanol. Os meios fermentativos em que a levedura foi analisada foram no sintético, no hidrolisado, no sintético na presença de inibidores e no hidrolisado suplementado. O mesmo faz parte do Projeto da Embrapa Agroenergia – Fontes Alternativas de Biomassa para a Produção Sustentável de Etanol a partir de Materiais Lignocelulósicos tendo como foco a fermentação.

1.1 Produção de Bioetanol de materiais lignocelulósicos

Com a expectativa da diminuição das reservas de petróleo, o custo elevado para sua obtenção e os problemas ambientais correlacionados a sua utilização como principal fonte de combustíveis e outros produtos químicos, tem levado à busca incessante de, de novas fontes energéticas, em todo o planeta, como as fontes energéticas renováveis. Dessa forma, por motivos econômicos, geopolíticos e ambientais, as atenções do mundo se voltam para fontes alternativas de energia, em especial para o etanol.¹¹

Há muitos anos o Brasil e os Estados Unidos tem desenvolvido estudos para obtenção do biocombustível etanol da cana de açúcar e do amido do milho, respectivamente, na tentativa de propor alternativas que levem a substituição de combustíveis fósseis devido ao aumento e a variação dos preços do petróleo.¹

E devido aos problemas ambientais que os combustíveis fósseis desencadeiam e a crescente procura por fontes de energia de recursos renováveis as pesquisas têm crescido em grande escala. Estas pesquisas tem o intuito de desenvolver métodos que viabilize a produção de bioetanol através da biomassa lignocelulósica proveniente de resíduos da agroindústria.¹¹

Primeiramente é importante definir biocombustível: é o combustível elaborado a partir da transformação de diferentes materiais orgânicos disponíveis de uma maneira renovável, por exemplo: produtos agrícolas, produtos florestais, resíduos agrícolas e florestais, resíduos industriais, algas e resíduos animais, entre outros.¹²

Existem diferentes biocombustíveis e estes podem ser obtidos de variadas matérias-primas a partir de diferentes processos térmicos, químicos e bioquímicos. Os açúcares e os amidos (cana de açúcar, mandioca, milho, beterraba e trigo) utilizam processos fermentativos e produzem etanol, butanol, etil, butil, éter, além de outros produtos. As biomassas (bagaço de cana, madeira, resíduos agrícolas e resíduos de fazendas) fazem uso de processos de gaseificação e de fermentação e podem produzir biodiesel, etanol, butanol, metanol, dimetileter entre outros. Já óleos e gorduras (vegetal, animal e residual) passam por processos de transesterificação para a obtenção do biodiesel (éster etílico e éster metílico).¹³

O etanol produzido com base na biomassa lignocelulósica utiliza processos químicos (empregando ácidos) ou da biotecnologia moderna (empregando enzimas)

para a quebra de moléculas de celulose e produção de açúcares, após este processo há a produção de etanol por meio de processos fermentativos alcóolicos da biotecnologia convencional.¹⁴

1.2 A madeira

A madeira é usada desde os primórdios para diferentes finalidades. Além de ser uma matéria prima abundante a madeira é uma fonte com grande poder de renovação e sua utilização esta cada vez mais presente no nosso dia a dia.

Sem dúvida a madeira é um material bem conhecido e utilizado em vários campos tecnológicos. Uma das espécies que tem sido empregada em grande escala é o eucalipto, devido ao seu crescimento rápido e por suas ótimas características físicas e químicas. Em razão da preocupação com o meio ambiente e o crescente uso desta madeira, diversos estudos tem sido realizados. Dentre eles, destacam-se o desenvolvimento do reflorestamento, a clonagem de espécies e as mudanças genéticas em algumas espécies, além de outras pesquisas voltadas para a caracterização química e física da madeira e de seus produtos.¹⁵ Dessa forma, a madeira hoje é um dos mais importantes recursos renováveis disponível para o homem. Podendo ser usada para a fabricação de biocombustíveis e de outros materiais de manufaturamento.³

Contudo, ainda é um desafio trabalhar com este material para a produção de açúcares/etanol, devido ao arranjo de seus componentes físicos (macroscópicos, microscópicos e ultramicroscópicos) e químicos, pois proporcionam à sua estrutura lenhosa uma organização bem definida.¹⁶

A composição química de uma madeira de determinada espécie pode variar com as diferentes partes da árvore (raízes, tronco, ramos e casca), bem como pelas condições ambientais de crescimento (localização geográfica, clima, tipo de solo, etc.). Contudo, são considerados, de uma maneira geral, dois grandes grupos de componentes químicos da madeira: os componentes estruturais e os componentes não estruturais ou extrativos. O primeiro grupo é composto pelas substâncias macromoleculares que são: a celulose, as hemiceluloses e a lignina. No segundo grupo fazem parte as substâncias de baixa massa molecular como os extrativos e substâncias minerais, vulgarmente chamadas de cinzas.¹⁷

1.3 Resíduos gerados pelo uso da madeira

Os resíduos gerados em todo o mundo são recurso de grande potencial para a obtenção de energia sendo a biomassa uma das principais fontes promissoras que podem gerar energia.

Neste sentido, os resíduos florestais constituem parte importante na disponibilidade da biomassa em alguns países pelas grandes quantidades geradas na colheita e na ação industrial. Essa fonte energética está encontrando mercado, em consequência do desenvolvimento tecnológico e dos baixos custos que representa sua utilização eficiente. Podemos citar, por exemplo, as indústrias madeireiras, como as serrarias e mobiliário, que produzem resíduos a partir do beneficiamento de toras. Os tipos de resíduo produzidos são casca, cavaco, costaneira, pó de serra, maravalha e aparas.¹⁸

1.4 O material lignocelulósico

A biomassa, é uma forma indireta de energia solar, sendo convertida em energia química. Essa energia química pode ser liberada diretamente por combustão, ou convertida através de algum processo em outras fontes energéticas como álcool e carvão vegetal.¹⁹

Biomassa é qualquer tipo de matéria orgânica de origem vegetal ou animal que dispõe de bioenergia e que pode ser processada para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final.¹

A Agência Internacional de Energia (AIE) calcula que nos anos 2040 cerca de 30% do total da energia consumida pela humanidade será proveniente das fontes renováveis, que hoje representam 14% da energia produzida no mundo, sendo que a biomassa tem 11,4% na participação da oferta.¹⁸

Biomassa lignocelulósica são materiais formados por estruturas cristalinas e fibrosas, compostas principalmente de celulose e hemicelulose, entremeados por outra macromolécula formada por álcoois aromáticos, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio.²⁰

A composição química da biomassa lignocelulósica mais apropriada para aplicação na produção de biocombustíveis, geralmente contém 35-50% de celulose,

seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. Esta composição química varia em função do tipo de biomassa.^{1,2}

1.4.1 Celulose

O principal componente da parede celular da fibra vegetal, a celulose, é um polímero natural de cadeia longa mais abundante em todo o mundo (Figura 1).⁸ Sua estrutura forma-se pela união de moléculas de β -D-glicose através de ligações β -1,4-glicosídicas carbono-carbono, onde é estabelecido inúmeras ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das diferentes cadeias de glicose, o que as torna impermeáveis a água e, conseqüentemente, insolúveis.²

As ligações intermoleculares (ligações entre unidades de glicose de moléculas vizinhas) são responsáveis pela rigidez. E as ligações intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) são responsáveis pela formação de fibrilas, estruturas bastante organizadas que se agregam e formam as fibras de celulose. Como resultado das ligações de hidrogênio, as moléculas de celulose podem formar regiões cristalinas e amorfas, e conseqüentemente, tornam a celulose bastante resistente à qualquer ação externa.²

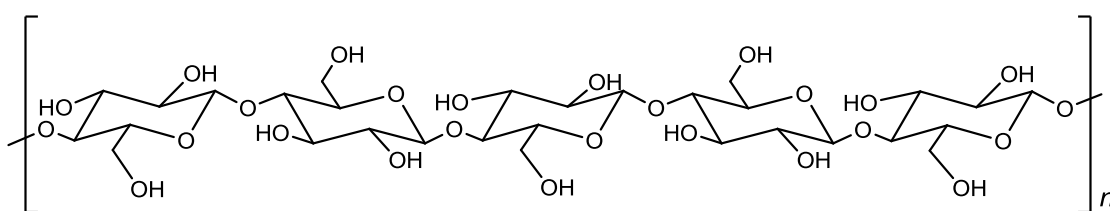


Figura 1 - Representação esquemática da molécula de celulose. (adaptada da ref. 2).

1.4.2 Hemicelulose

Outro componente essencial na parede celular são as hemiceluloses, que são polissacarídeos formados por diferentes unidades de açúcares pertencentes aos grupos das pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose, galactose).

Esta macromolécula possui também, ácidos hexurônicos, como os ácidos D-glucorônico e o ácido 4-O-metil-glucurônico (Figura 2). São estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina, e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado.²²

Em comparação com a celulose, as hemiceluloses apresentam baixo grau de polimerização, não formam arranjo fibroso e apresentam somente regiões amorfas possibilitando maior susceptibilidade à hidrólise química, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores.²³ Porém, a fermentação dos açúcares derivados das pentoses ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo glicose.⁹

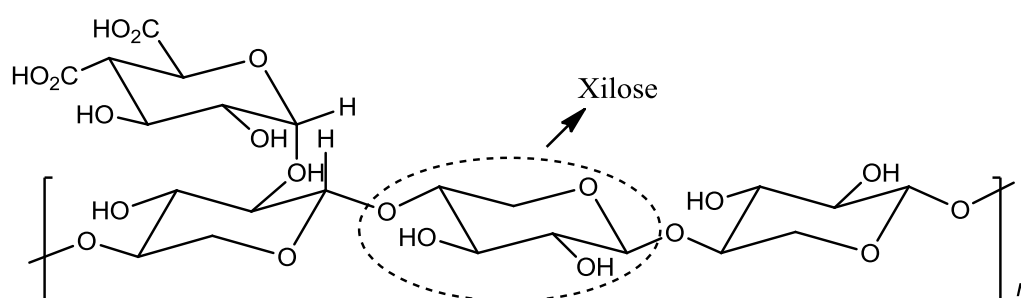


Figura 2 - Representação esquemática da hemicelulose. (adaptada de ref. 2)

1.4.3 Lignina

Uma das substâncias orgânicas macromoléculas naturais mais abundantes, depois da celulose, é a lignina (Figura 3). Sua estrutura é bastante heterogênea e consiste em uma rede de anéis aromáticos unidos, principalmente por ligações alquil-éter, formando um arranjo amorfo com grandes quantidades de ligações cruzadas entre os anéis aromáticos. Esta macromolécula é formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico.²²

Atua como uma barreira física, no processo de hidrólise enzimática, para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina, influenciando na quantidade de enzima que será usada na hidrólise, e, além disso, dificulta a recuperação da enzima após a hidrólise.²³ A lignina, no entanto, desempenha um

papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, pois dificulta o acesso à celulose.

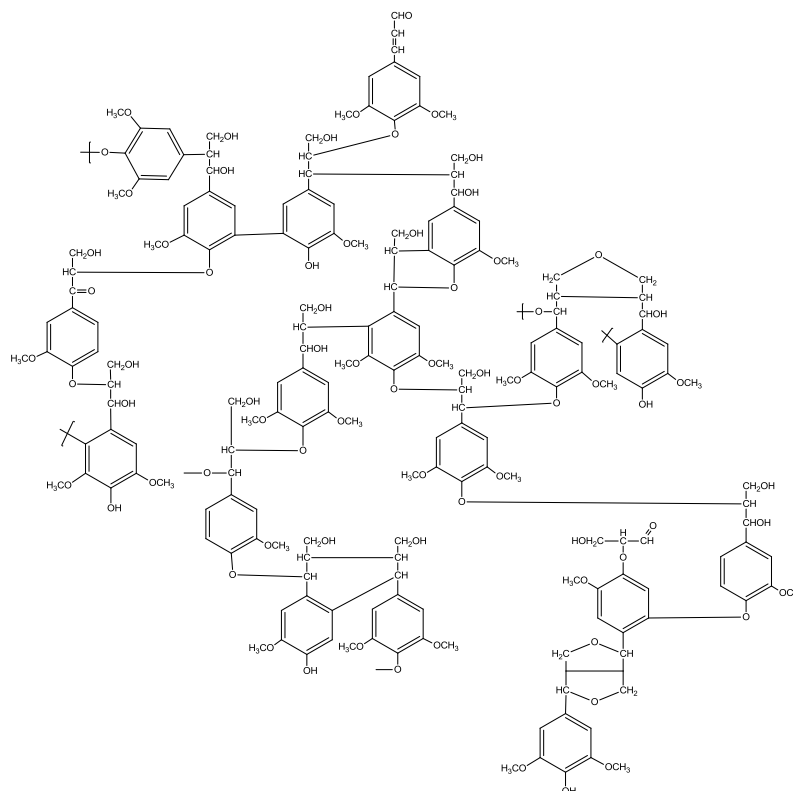


Figura 3 - Representação esquemática da lignina de eucalipto. (adaptada de ref. 2).

1.5 Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos

A conversão da biomassa lignocelulósica a etanol ocorre normalmente em quatro etapas: (1) pré-tratamento, para melhorar a digestibilidade enzimática ou microbiana de componentes polissacarídeos; (2) hidrólises da celulose e da hemicelulose, hidrolisam estes polímeros em monômeros, (glicose e xilose e arabinose, respectivamente); (3) fermentação do açúcar em combustível líquido; (4) destilação, onde é separado o etanol presente no fermentado.^{9,24,25}

Dessa forma, o pré-tratamento é uma etapa fundamental para o processo de conversão da biomassa em etanol lignocelulósico, pois nesta etapa é que há a modificação da estrutura da biomassa, que atuam como barreiras que impedem a ação das enzimas celulasas durante a etapa da hidrólise enzimática.⁹

1.5.1 Pré-tratamentos

A etapa do pré-tratamento é de suma importância para se alcançar um rendimento satisfatório de açúcar fermentável e por sua vez influencia as outras etapas subsequentes.^{1,2,20} O objetivo do pré-tratamento é separar a lignina e a hemicelulose, do material lignocelulósico, sendo possível a utilização e aproveitamento de cada parte deste material. Além disso, o pré-tratamento aumenta a área superficial e diminui o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose, aumentando a porosidade dos materiais.²⁶

Com o pré-tratamento é possível melhorar a formação de açúcares; evitar a degradação ou perda de carbono; evitar a formação de inibidores aos processos de hidrólise e fermentação, aumentando por consequência seu custo-benefício.⁹

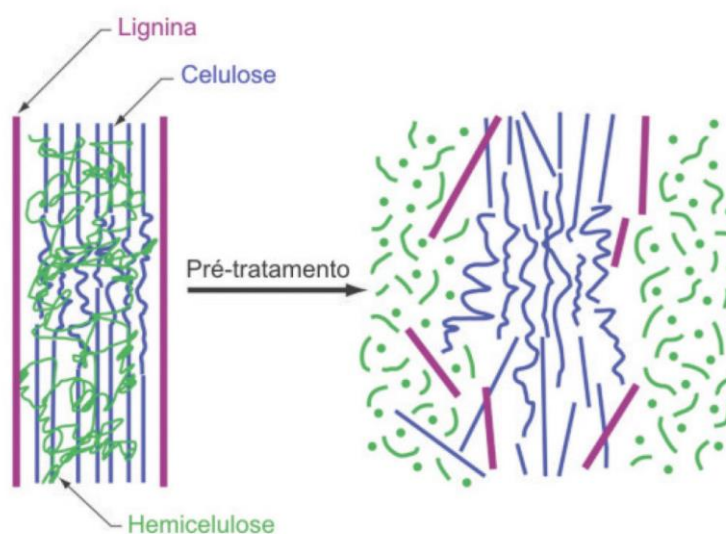


Figura 4 - Alterações estruturais do complexo celulose - hemicelulose - lignina determinadas pelo pré-tratamento. (adaptada da ref. 2)

A lignina e a hemicelulose devem ser seletivamente removidas pelos métodos de pré-tratamentos biológicos, físicos, químicos, físico-químicos ou por combinação destes.²⁷ Acredita-se que a eficiência destes processos é a chave para uma eficiente

degradação enzimática do material lignocelulósico satisfatória.²⁶

Cada método de pré-tratamento tem vantagens e desvantagens, tais como: (1) método biológico – não agride o meio ambiente, usa fungos e bactérias, tem baixo requerimento de energia e efetiva deslignificação, mas requer um tempo excessivo de 10-14 dias; há perda de celulose; baixa taxa de hidrólise; (2) método físico – reduz mecanicamente o tamanho da partícula da biomassa, mas exige energia; é caro e não remove a lignina; (3) método químico – há uma descristalização da celulose, um alto rendimento da celulose e uma efetiva deslignificação; difícil de recuperação de ácidos; é corrosivo, altamente danoso ao meio ambiente, e há perda da lignina; (4) método físico-químico – modifica a estrutura da lignocelulósica, aumenta a área de superfície e melhora a purificação da celulose, mas exige altas pressões e temperaturas e uso de catalisadores.^{9,25,26,28}

O tratamento atualmente mais empregado para obtenção de celulose é o processo químico *Kraft*, que envolve o cozimento da matéria-prima com uma solução contendo hidróxido (hidrólise alcalina) e sulfeto de sódio, utilizando temperaturas em torno de 160 °C. Este processo remove grande parte da lignina presente na matriz lignocelulósica. Em geral, a celulose extraída apresenta coloração escura, e quando se trabalha na indústria de papel e celulose, contudo é necessário processos de branqueamento para atingir maiores níveis de brancura, levando em conta as perdas das propriedades físico-mecânicas da celulose.²⁹

Apesar de sua popularidade e eficiência, o processo químico *Kraft* envolve a utilização de uma variedade de produtos químicos tóxicos e perigosos e gera grandes quantidades de poluentes do ar e da água.²⁹ Além disso, no processo químico *Kraft* a lignina é degradada em frações solúveis em água sendo sua reutilização comprometida, e, dessa forma, toda a lignina é empregada na forma de queima para geração de calor utilizado nas caldeiras da própria indústria.²⁶

Há, entretanto, outros métodos de pré-tratamento como o *Ammonia fiber expansion* (AFEX) que é muito eficaz e está sendo bastante difundido nos Estados Unidos. O AFEX tem a função de descristalizar as fibras de celulose, hidrolisar a hemicelulose, remover a lignina despolimerizada e aumentar em tamanho e número os microporos da parede celular da biomassa.²¹

Além destes processos há o hidrotérmico que consiste no tratamento da biomassa com água a temperaturas elevadas, há a explosão com vapor onde a biomassa é tratada com vapor saturado sob alta pressão e temperaturas elevadas às

quais modificam as estruturas da biomassa tornando-a mais branda para a sacarificação.²¹

Neste contexto, o sucesso do processo de pré-tratamento deve ser desenvolvido pensando no processo como um todo, envolvendo a hidrólise enzimática, a fermentação e, além disso, o tratamento da água residual, visando a não contaminação do meio ambiente.¹

1.5.2 Hidrólise

A etapa da hidrólise da biomassa lignocelulósica é uma etapa essencial para o processo de obtenção de etanol lignocelulósico. É a fase onde ocorre a sacarificação da celulose (Figura 5).^{1,25,32,33} A hidrólise da celulose pode ser realizada por dois métodos a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática.³²

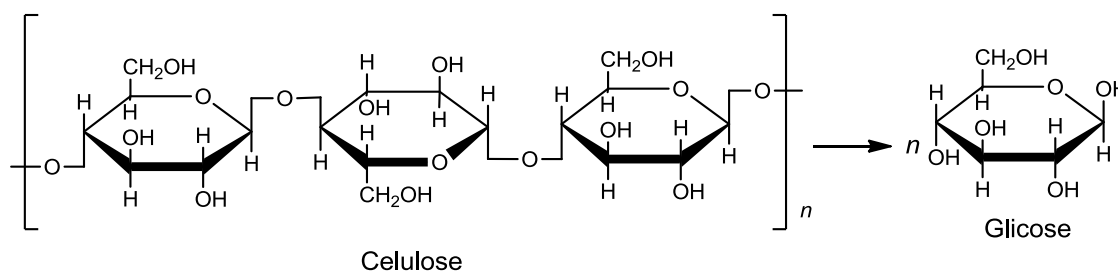


Figura 5 - Hidrólise da celulose. (adaptada da ref. 33)

1.5.2.1 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é conduzida através de enzimas celulasas, que são altamente específicas. Normalmente as celulasas são uma mistura de diversas enzimas. Os três maiores grupos de celulasas que estão envolvidas no processo de hidrólise são: endoglucanases, exoglucanases e betaglucosidase.⁹

As endoglucanases atuam aleatoriamente ao longo da molécula de celulose. No entanto, as exoglucanases atuam nas regiões terminais das moléculas de celulose, promovendo a sua despolimerização gradativa através da remoção de

unidades de celobiose terminais. A celobiose é um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose, produto da hidrólise incompleta da celulose. Finalmente, as betaglucosidases hidrolisam celobiose a glicose.³⁴

Em princípio, as rotas enzimáticas apresentam vantagens importantes sobre as rotas químicas, no contexto da produção de bioetanol. Na maioria das vezes, o processo de hidrólise enzimática apresenta vantagens associadas à obtenção de rendimentos, para bagaço de cana, superiores a 0,85 g glicose/g celulose, sob temperaturas moderadas (40 °C a 50 °C) e pressão atmosférica. Entretanto, aspectos operacionais relacionados ao longo tempo do processo (48 a 72 horas), desativação catalítica pela inibição da atividade enzimática, bem como do alto custo das enzimas, têm deixado dúvidas quanto à viabilidade econômica do processo de hidrólise enzimática para a produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas.^{1,35}

1.5.2.2 Hidrólise química

A hidrólise química da celulose foi uma das primeiras alternativas a serem testadas, contudo mostrou limitações como a formação de inibidores que podem interferir na fermentação (compostos fenólicos, ácidos acéticos, furfural e hidroximetilfurfural), e a degradação de açúcares por exposição prolongada ao meio reacional, além da corrosão de equipamentos.³⁶

É caracterizada por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como ácido clorídrico e sulfúrico, e condições rígidas de pH, temperatura e tempo (pH 1 e 2 – temperatura entre 100 a 150 °C – tempo de 30 a 60 minutos).^{1,11}

A hidrólise ácida é realizada em diversos compostos orgânicos (ésteres, açúcares, aminas, etc). Além dos ácidos mais utilizados, outros ácidos são empregados. Ácido fórmico e tricloroacético têm menor atividade, mas produzem reações mais limpas. Ácido oxálico e benzeno-sulfônico são mais ativos que sulfúrico.³⁷

Para quebrar os polímeros celulose e hemicelulose em monômeros, glicose e xilose, pela hidrólise ácida, a biomassa lignocelulósica é exposta ao ácido por um período de tempo e em temperaturas específicas. O ácido sulfúrico (H₂SO₄), normalmente, é o mais investigado, contudo o ácido clorídrico (HCl) também tem sido utilizado na produção de etanol lignocelulósico. A hidrólise ácida pode ser com ácido

concentrado ou ácido diluído. Porém, existem vantagens e desvantagens em cada caso, mas o que mais chama a atenção é o impacto ambiental, negativo, que os ácidos podem produzir.³⁸

Entretanto, o processo de hidrólise ácida tem alguns por menores como a corrosão dos equipamentos e a possível formação de subprodutos. Contudo, o rendimento glicosídico da ordem de 80% a 85% torna a tecnologia potencialmente interessante para produção de etanol lignocelulósico.¹

1.5.3 Fermentação

A fermentação etanólica é um fenômeno bioquímico muito complexo que provoca a transformação de açúcares a etanol, gás carbônico, ácidos succínicos, ácidos voláteis e ésteres.³⁹

A fermentação é um processo catabólico anaeróbico em que há a degradação de moléculas de açúcar, no interior das células de microrganismos, até a formação de etanol e CO₂, havendo liberação de energia química e térmica. As leveduras são os microrganismos mais empregados na obtenção de etanol por via fermentativa.⁴¹

Seu processo é iniciado com a glicólise, também chamada de *via Embden-Meyerhof*, ocorrendo a oxidação da glicose em duas moléculas de ácidos pirúvicos em dois momentos, sendo na presença ou não de oxigênio. No primeiro momento, para a fosforilação da molécula de glicose são usadas duas moléculas de adenosina trifosfato – ATP, em seguida é reestruturada e quebrada em dois compostos de três carbonos: gliceraldeído 3-fosfato e diidroxiacetona fosfato, que é convertida rapidamente em gliceraldeído 3-fosfato. No segundo momento, as moléculas de gliceraldeído geradas são oxidadas em duas moléculas de ácido pirúvico. Nessas reações, ocorre a redução das duas moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo – NAD⁺ a NADH e quatro moléculas de ATP são formadas pela fosforilação em nível de substrato, com saldo final positivo de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose que é oxidada. Após a glicólise, há a conversão das duas moléculas de ácido pirúvico em dois acetaldeído e do dióxido de carbono – CO₂. Para a formação de etanol, produto final da fermentação, as moléculas de acetaldeído são reduzidas por duas moléculas de NADH.^{10,39}

A fermentação etanólica inicia-se, após a adição do microrganismo ao meio

fermentativo, ou seja, um meio rico em açúcares. Mas, existem três fases para que ocorra o processo de fermentação, logo após a adição do microrganismo: a fase lag onde ocorre a adaptação dos microrganismos ao novo ambiente, e os mesmos dão início ao seu crescimento, e neste meio fermentativo existe, ainda, oxigênio disponível para que ocorra a desenvolvimento das leveduras. A segunda fase, que é a fase exponencial, é determinada pelo grande aumento de microrganismos e pela liberação de gás carbônico, nesta fase o crescimento é na ordem de 2^n . É onde haverá o aumento da temperatura e do teor alcóolico. Na fase estacionária, o alimento já está muito pobre no meio e o crescimento das leveduras é afetado, além disso, há diminuição de gás carbônico e precipitação do microrganismo. A fase de morte é caracterizada pela morte celular, pois o próprio meio, rico em etanol já não é benéfico ao microrganismo. No final da fermentação o produto obtido é o caldo bruto, que irá apresentar 8 a 12% de etanol.⁴⁰

Como relatado, a etapa de fermentação etanólica é um processo biológico, cujo principal agente é a levedura e ocorre com a transformação de açúcares, em etanol e CO_2 , através deste microrganismo. Contudo, existem fatores que afetam a fermentação, o que causa uma perda no seu rendimento, ou seja, a porcentagem do açúcar que se transforma em etanol não tem relação à quantidade máxima teórica da equação de Gay-Lussac, descrita no capítulo de materiais e métodos.⁵³

1.5.3.1 O microrganismo da fermentação

As leveduras são os microrganismos mais empregados na obtenção de etanol por via fermentativa. As leveduras utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas e combustíveis geralmente são das linhagens *Saccharomyces cerevisiae*.⁴¹

A *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 6) é amplamente utilizada na produção comercial de etanol proveniente de açúcares, tais como os da sacarose da cana de açúcar e os da maltose do amido do milho.⁴² A sacarose é hidrolisada pela *S. cerevisiae* em glicose e frutose, duas hexoses com alto rendimento fermentativo.⁴³ A função da levedura é transformar anaerobicamente o carboidrato, para gerar ATP que é uma fonte de energia necessária para o seu desenvolvimento, como o seu crescimento e sua multiplicação, além da sua sobrevivência.³⁹

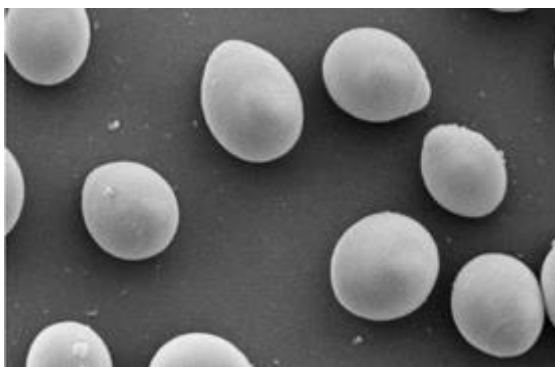


Figura 6 - Imagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.⁴⁴

Para a produção de bioetanol lignocelulósico deve-se levar em conta que a porção hemicelulose da biomassa lignocelulósica além de produzir hexoses na sua degradação produz açúcares como a xilose e a arabinose, que são pentoses. Entretanto, as leveduras *S. cerevisiae* são incapazes de assimilar ou fermentar pentoses.⁴⁵ O fato mais importante, contudo, é a interferência de compostos formados nas etapas precedentes a fermentação que afetam a formação do etanol.⁴⁶

Variados fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécies, linhagem e concentração de leveduras, contaminação bacteriana) prejudicam o rendimento da fermentação, isto é, a capacidade da levedura em converter açúcar em etanol.⁴⁷

1.5.3.2 Os inibidores da fermentação

Nas etapas do pré-tratamento ou na hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica há a formação de açúcares derivados da hidrólise e da dissolução da celulose e hemicelulose, mas há a formação, também, de compostos que podem atuar como inibidores em potencial da fermentação.⁴⁷

Estes produtos de degradação, que são potenciais inibidores da fermentação, são divididos em três categorias: os derivados do furano; ácidos alifáticos de baixa massa molecular; derivados fenólicos.⁴⁶

Em função das elevadas temperaturas aplicadas nos pré-tratamentos, os açúcares produzidos na hidrólise, principalmente da hemicelulose, se degradam

gerando os compostos derivados do furano: o furfural, que é formado pela degradação das pentoses (xilose e arabinose) e o 5-hidroximetilfurfural (HMF), que por sua vez é formado pela da degradação das hexoses (glicose, manose e galactose).⁴⁶ Estes inibidores danificam as paredes e membranas celulares, inibem o crescimento celular, reduzem atividades enzimáticas, causam danos ao DNA (ácido desoxirribonucleico), inibem a síntese de proteínas e RNA (ácido ribonucleico), e reduzem a produção de etanol.⁴⁸

O ácido acético, um ácido alifático, é formado pela hidrólise do grupo acetil presente na hemicelulose. A sua presença no meio fermentativo ocasiona um aumento no consumo de ATP pela levedura, nessas condições, parte do ATP que seria utilizado para o crescimento ou fermentação é desviado para manutenção de seu pH interno.⁴⁹

Os compostos fenólicos, formados principalmente pela degradação parcial da lignina, podem inibir a bioconversão, inibindo a atividade enzimática, destruindo a integridade da membrana e afetando as suas propriedades, como a barreira seletiva.³⁶

Os estudos relatam que a maioria das leveduras, incluindo linhagens industriais, é suscetível a furfurais derivados do hidrolisado, e especialmente suscetível a combinação destes inibidores. Embora o furfural seja mais tóxico do que o 5-HMF, eles atuam em conjunto para suprimir o crescimento da levedura. Contudo, para amenizar os efeitos dos inibidores, tratamentos adicionais são requeridos, incluindo detoxificação química, física e bioquímica. No entanto, esses passos adicionais acrescentam custos e complexidade ao processo e geram resíduos. Portanto, o desenvolvimento de leveduras modificadas geneticamente com maior tolerância a inibidores, especialmente aos furfurais, é uma alternativa promissora à etapa de detoxificação.⁵⁰

2 - Objetivos

2.1. –Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a produção de etanol a partir da celulose presente na biomassa lignocelulósica, *Eucalyptus urophylla*, focando principalmente na etapa de fermentação, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e analisando seu comportamento.

2.2 –Objetivos Específicos

Disponibilizar a celulose através das etapas de pré-tratamento ácido e alcalino;

Hidrolisar o polímero de celulose em açúcares fermentescíveis pela etapa da hidrólise enzimática;

Avaliar o comportamento da levedura em diferentes meios fermentativos, como meio sintético, meio hidrolisado, meio sintético com inibidores e meio hidrolisado com suplemento;

Verificar se há presença de inibidores no hidrolisado de eucalipto e como a levedura se desenvolve neste meio;

Quantificar a taxa de crescimento, as taxas de conversão de substrato em células e em produto, e o rendimento dos processos nos meios fermentativos;

Diferenciar as fermentações comparando a produção de cada meio analisado.

3. Materiais e métodos

3.1 Materiais

- ✓ Para a produção dos hidrolisados lignocelulósicos foi utilizada a espécie de eucalipto *Eucalyptus urophylla* – EU, cultivada na região entre Ponta Porã – MS e Dourados – MS, fornecida pela Embrapa Floresta, localizada em Colombo, distrito de Curitiba – PR, como citado anteriormente. Na hidrólise enzimática utilizou-se o complexo enzimático Cellic®CTec2, da Novozymes.
- ✓ A fermentação alcoólica foi realizada utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* – CAT-1 (levedura para a produção de etanol). Para o meio sintético foi utilizado: Extrato de levedura – HIMEDIA; Peptona bacteriológica – HIMEDIA; Glicose – Vetec. Além dos micronutrientes (NaNO₃ – Vetec; KH₂PO₄ – CRQ; MgSO₄ – Vetec; KCl – Sigma/Aldrich; FeSO₄ – Alphatec; ZnSO₄ 7H₂O – Alphatec).
- ✓ Para a produção de tampões e das soluções utilizadas nos pré-tratamentos e na hidrólise foram usados reagentes químicos: ácidos (H₂SO₄ – J.T. Baker; C₆H₈O₇ – Vetec), bases (NaOH – Sigma-Aldrich), sais (Na₃C₆H₅O₇ – SAFC).

3.1.1 Equipamentos

Equipamentos utilizados nas análises e procedimentos:

- ✓ Espectrofotômetro Multimodal com absorvância UV/VIS, marca Molecular Devices, modelo Spectramax.
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE. Marca Agilent, modelo 1260 Infinity. Coluna Aminex HPX-87H e detector índice de refração. Fase móvel H₂SO₄ 0,005 M, vazão de 0,6 mL/min, e temperatura de 45 °C. Clarificadas em cartuchos C18.
- ✓ Shaker orbital de bancada com incubação e refrigeração, marca Thermo Scientific, modelo Max 4000.
- ✓ Moinho de facas tipo Willey, marca Fortinox, modelo Macor Star FT-60

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo da biomassa

O material lignocelulósico que se encontrava em forma de cavacos foi processado em moinho de facas tipo *Willey*, com granulometria máxima de 3 mm.

3.2.2 Pré-tratamento

O pré-tratamento foi realizado em duas etapas: o pré-tratamento ácido e o alcalino. Sendo cada etapa realizada em dias subsequentes.

3.2.2.1 Pré-tratamento ácido

Foram pesados, separadamente, em 15 béqueres de plástico de 250 mL, 20 g da madeira sólida bruta. Preparou-se uma solução ácida de ácido sulfúrico e água destilada de forma a se obter uma solução de 1,5% (v/v) de ácido sulfúrico – H₂SO₄. Esta solução foi adicionada a cada béquer, contendo a madeira, numa razão sólido/líquido de 1/10 (200 mL de solução).

O material é autoclavado a pressão de 1 atm e a temperatura de 121°C por 30 minutos. Para separar a fração sólida da líquida, por filtração, foi utilizado filtro de tecido e espremido com o intuito de retirar ao máximo a parte líquida. O sólido foi lavado duas vezes com água destilada. Cada lavagem conteve o mesmo volume de solução ácida utilizada no pré-tratamento (200 mL para cada béquer). Todas as frações sólidas foram misturadas. Deste material foi retirada uma alíquota para a realização de matéria seca e o restante guardado em geladeira para ser utilizado posteriormente no pré-tratamento alcalino. Após a secagem do material retirou-se 3 g em base seca da fração sólida para a caracterização em triplicata.

3.2.2.2 Pré-tratamento alcalino

Pesou-se, separadamente, em 15 béqueres de plástico de 250 mL o material que foi

lavado após a etapa do pré-tratamento ácido. Preparou-se uma solução alcalina, hidróxido de sódio – NaOH 4% (m/v) em água destilada. Com o peso seco do material, adicionou-se a solução alcalina ao béquer contendo o material numa razão sólido seco/líquido de 1/10.

O material misturado com a solução alcalina foi autoclavado a pressão de 1 atm e a temperatura 121°C por 30 minutos. Após atingir o tempo determinado os béqueres foram retirados imediatamente da autoclave e ocorreu a lavagem desse material com água destilada fervente, aproximadamente 1 L. Para a filtração foi usado o tecido mencionado na etapa anterior, e foi retirado todo o excesso de água. Deste material foi retirada uma alíquota para a realização de matéria seca e após a secagem do material retirou-se 3 g em base seca da fração sólida para a caracterização em triplicata.

3.2.3 Caracterização da biomassa

As amostras de biomassa, madeira bruta, madeira pré-tratada com ácido e madeira pré-tratada com base, foram pesadas, em frascos *Duran*, exatamente 1 g. Preparou-se uma solução de ácido sulfúrico – H₂SO₄ 72% (v/v) e transferiu-se 5 mL para um tubo de ensaio. As amostras e os tubos de ensaio contendo a solução ácida foram colocados em banho térmico a 45 °C e agitada por 7 minutos. Em seguida o frasco foi retirado do banho e adicionou-se água destilada para interromper a reação. Transferiu-se a amostra para um erlenmeyer de 250 mL lavando o frasco até completar o volume de 125 mL, que foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 minutos a 121 °C e 1 atm.

A fração sólida foi separada da fração líquida por filtração, sendo lavada com água destilada até completar um balão volumétrico de 250 mL. A solução foi armazenada, em congelador, para análise dos açúcares presentes em cada material utilizado.⁵⁷

Na caracterização foi possível quantificar a porcentagem de celulose, através da glicose, e a hemicelulose, através da xilose. A lignina não foi determinada neste estudo, dessa forma é referida como outros, juntamente com os extrativos e as cinzas.

O método utilizado foi adaptado a fim de diminuir a quantidade de resíduos

químicos gerados durante o procedimento. Os mesmos eram tratados após os procedimentos.

3.2.4 Hidrólise enzimática

O material resultante das etapas de pré-tratamento foi dividido em erlenmeyers de 250 mL (aproximadamente 12 frascos), contendo a mesma quantidade de sólido. Preparou-se uma solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5. A quantidade de tampão necessária para a hidrólise enzimática foi calculada considerando a diluição de 1 g do material em base seca para 10 mL de tampão. A quantidade de enzima adicionada (15 FPU/g de substrato seco) foi calculada a partir dos dados de peso seco e da diluição da enzima em tampão (solução de 1/5).

Após agitação retirou-se uma primeira alíquota de 1 mL (tempo zero) de cada erlenmeyers em *eppendorfs* e centrifugada imediatamente. A parte líquida foi armazenada congelada em *eppendorfs*, para posterior análise da quantidade de glicose presente na amostra no CLAE.

Os erlenmeyers com as amostras foram colocadas e Shaker rotativo de maneira aleatória, submetidos à temperatura de 50 °C e agitação de 200 rpm por 24 horas, conforme a Figura 7. Após as 24 horas (tempo final) retirou-se, novamente, uma alíquota de cada frasco e procedeu-se da mesma maneira do ponto zero. O restante das amostras foram centrifugadas.



Figura 7 - Hidrólise enzimática após 24 horas de incubação.

3.2.5 Fermentação

3.2.5.1 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o YPG – Extrato de levedura (Yeast extract), Peptona bacteriológica e Glicose. A concentração utilizada foi de 10%, sendo 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona bacteriológica e 100 g/L de glicose os meios são esterilizados.

3.2.5.2 Técnica de esgotamento

As colônias de leveduras foram separadas pela técnica de esgotamento. O meio usado para o esgotamento foi o mesmo, contudo com uma concentração de glicose de 2% e acrescentou-se 20 g/L de Agar a fim de que o meio se tornasse sólido. O meio foi esterilizado. Após esterilização foi vertido em placas de Petri, em ambiente estéril.

Para a técnica de esgotamento as placas de Petri foram divididas em três setores, fazendo uma marcação com caneta na parte externa da base da placa, conforme Figura 8. Com o auxílio da alça de platina, flambada e resfriada, coletou-se uma porção de microrganismo e depositou-se sobre a superfície do meio de cultura no setor 1 em forma de estrias (Figura 8) tentando fazer o maior número de estrias

possível. Com a alça de platina esterilizada, novamente, e sem carregá-la com microrganismo deslizou-se a mesma sobre as últimas estrias que foram feitas no primeiro setor e foram feitas novas estrias no setor 2. Repetiu-se o procedimento para o setor 3, onde terá a menor quantidade de células, ocorrendo o crescimento de uma colônia proveniente de uma única célula, denominada cultura pura. Depois de terminado o procedimento levou-se as placas para incubação a uma temperatura entre 20 a 25 °C.

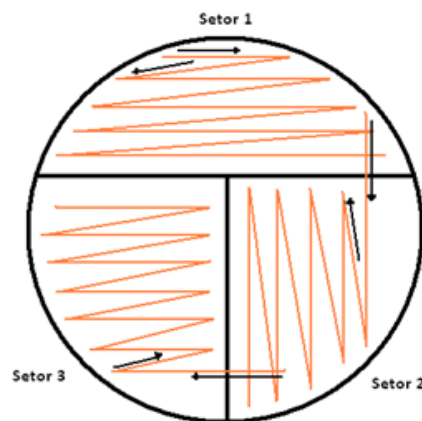


Figura 8 - Ilustração da técnica de esgotamento de cultura em placa de Petri com meio sólido.3.2.5.3 Dosagem de células

Para acompanhar o crescimento celular ao longo da fermentação utilizou-se o método de espectrofotométrico. O meio fermentativo foi diluído adequadamente e determinou-se a absorbância em espectrofotômetro a 650 nm. O valor lido foi comparado com uma curva padrão (Figura 11, página 32) que relacionou a absorbância com a concentração celular em termos de massa seca em gramas por litro, que foi construída conforme descrito abaixo. Para o branco foi utilizado água destilada.

3.2.5.3.1 Curva padrão

Massa seca

Para este procedimento o microrganismo foi inoculado em 100 mL de YPG 10%,

numa concentração aproximada a da fermentação e deixou-se crescendo em Shaker a 30 °C e 150 rpm por aproximadamente 12 horas.

O meio fermentativo foi homogeneizado e colocado em frascos *Falcon* de 50 mL para centrifugar por 15 minutos, para a completa sedimentação, retirou-se o sobrenadante, adicionou-se água destilada em seguida foi centrifugada novamente. Esta operação foi repetida três vezes seguidas.

Secaram-se três placas de *Petri* de vidro em estufa até massa constante e anotou-se a massa de cada um. Adicionou-se a levedura lavada em cada placa e foram anotadas as massas de cada placa. Estas foram levadas para estufa a 80 °C para secagem até massa constante. Pesaram-se as placas e determinou-se a massa de sólido seco em cada uma. Com o volume centrifugado conhecido e a massa de sólido seco foi possível determinar a concentração celular em g/L presente no meio.

Determinação da razão massa de célula versus comprimento de onda

Com o mesmo meio fermentado foram feitas leituras no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 650 nm, em diferentes diluições. As diluições adequadas dependeram da concentração celular em que se encontrava o meio. Usou-se como branco água destilada. O procedimento foi realizado em triplicata.

Conhecidas as absorvâncias relacionadas à cada concentração, pode-se então construir a curva padrão que forneceu a concentração de leveduras em base seca, em g/L (ordenada), para cada absorvância lida (abscissa). Obteve-se a equação da reta e o R^2 .

Determinação da concentração nas amostras

A turbidimetria, técnica utilizada para quantificar o crescimento microbiano, faz o monitoramento do crescimento bacteriano através da densidade ótica (DO). É o método mais simples e rápido para se obter resultados, uma desvantagem da turbidimetria, é não conseguir distinguir as células viáveis das não viáveis.

Com as amostras homogeneizadas e diluídas dentro do intervalo especificado pela curva padrão foram feitas as leituras das absorvâncias no espectrofotômetro a 650 nm. O branco utilizado foi água destilada e o procedimento foi realizado em

triplicata para cada amostra.

3.2.5.4 Fermentação meio sintético

Após 24 horas do crescimento da colônia da levedura verteu-se em frascos de erlenmeyer de 500 mL (aproximadamente 4 frascos) para que houvesse o crescimento da levedura novamente, por aproximadamente 6 horas. Em seguida foram centrifugadas e divididas em frascos de erlenmeyer de 500 mL para um novo crescimento por 12 horas. Para obter a levedura concentrada, as mesmas foram centrifugadas e calculou-se a concentração pela equação da curva de crescimento como descrito anteriormente e esta demonstrado na Figura 12 da página 34.

Sabendo a concentração da levedura calculou-se o volume a ser pipetado do mesmo para uma concentração de 10 g/L. este volume foi adicionado ao meio sintético. Anotou-se o tempo inicial e foram retiradas alíquotas, de 1 mL de cada amostra, de 30 em 30 minutos. Essas amostras foram diluídas para a construção da curva de crescimento através da leitura da densidade ótica no espectrofotômetro. Em seguida foram centrifugadas e armazenou-se o sobrenadante para posterior análise do consumo de glicose e a produção de etanol, no CLAE.

Todo o procedimento foi mantido em Shaker a 30 °C e 150 rpm, tanto para o crescimento das leveduras quanto para a fermentação, e realizado em ambiente esterilizado em capela de fluxo laminar. Todo material usado foi esterilizado para evitar a contaminação da levedura.

3.2.5.5 Fermentação meio sintético com inibidores

Após as etapas de pré-tratamento e da hidrólise enzimática foram feitas análises, no CLAE, para verificar a existência de inibidores gerados. As amostras foram submetidas a análises sem diluição, para detectar os inibidores.

Com as concentrações dos inibidores furfural e HMF encontradas no CLAE adicionou-se em quantidades equivalentes as substâncias ao meio sintético e verificou-se o comportamento da levedura. A fermentação ocorreu de forma semelhante ao item anterior.

3.2.5.6 Fermentação meio hidrolisado

As amostras retiradas na etapa da hidrólise enzimática foram analisadas no CLAE para verificar a quantidade de glicose presente. De posse das análises o hidrolisado foi suplementado com glicose para uma concentração de 100 g/L.

Determinado o volume do creme de levedura descrito no item anterior para uma concentração de 10 g/L o meio hidrolisado foi inoculado para a realização da fermentação. O procedimento seguido foi o mesmo para o meio sintético.

3.2.5.7 Fermentação meio hidrolisado com suplementos

Com o meio hidrolisado já suplementado, conforme o item anterior foi adicionado o Meio Mínimo de Pontecorvo⁵¹ com algumas modificações, com a seguinte composição: 6,0 g de NaNO_3 ; 1,52 g de KH_2PO_4 ; 0,52 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,52 g de KCl ; 0,01 g de FeSO_4 ; 0,01 g de ZnSO_4 . Em seguida iniciou-se a fermentação da mesma maneira para os meios sintético e hidrolisado. A foto da Figura 9 ilustra os erlenmeyers com as fermentações desta etapa.



Figura 9 - Fermentação do meio hidrolisado com suplemento e meio sintético como contraprova.

3.2.6 Cálculos dos parâmetros de fermentação

Os parâmetros cinéticos da fermentação foram obtidos através da utilização dos cálculos da taxa específica máxima de crescimento, dos fatores de conversão de substrato em células e em produto e da eficiência de fermentação.

3.2.6.1 Taxa específica máxima de crescimento (μ_{\max})

A taxa específica de crescimento celular (μ_{\max}) foi calculada pela Equação 1.

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde X é a concentração celular (g/L) e t é o tempo (minutos).

3.2.6.2 Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$)

O fator de conversão de substrato em produto foi expresso em $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$, sendo calculado através da Equação 2.

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{-dS} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde P é a concentração do produto (g/L) e S é a concentração de substrato (g/L).

3.2.6.3 Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$)

O fator de conversão de substrato em células foi expresso em $\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{glicose}}$, sendo calculado através da Equação 3.

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{-dS} \quad (\text{Equação 3})$$

3.2.6.4 Eficiência de fermentação (E)

Foi calculada com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac (51,1 g_{etanol}/100g_{glicose}),⁵² segundo a Equação 4.

$$E = Y_{P/S} \cdot 100 / 0,511 \quad (\text{Equação 4})$$

4 – Resultados e Discussão

4.1 Caracterização química das biomassas bruta e pré-tratadas

Como relatado nos capítulos anteriores a madeira, biomassa lignocelulósica, é composta por celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas. A caracterização química é um dado essencial para este trabalho, pois através desta foi possível calcular e analisar o percentual das frações desta biomassa em diferentes estágios do processo.

Os resultados da caracterização da madeira em seu estado natural (bruta) e depois de passar pelas etapas de pré-tratamento ácido e alcalino são discutidos para demonstrar a quantidade de celulose disponibilizada e hemicelulose nos pré-tratamentos. Cabe ressaltar que o método usado nos pré-tratamentos são os mais utilizados no meio científico para a indústria de celulose, podendo ser realizado em diversos laboratórios e faz parte do Projeto da Embrapa Agroenergia – Fontes Alternativas de Biomassa para a Produção Sustentável de Etanol a partir de Materiais Lignocelulósicos, e o foco desta pesquisa é a fermentação. Com efeito, este estudo não tem como meta detalhar o pré-tratamento usado.⁹

4.1.1 Caracterização química da biomassa bruta

Na caracterização do eucalipto da espécie *EU* a quantidade de celulose verificada, dada pela média das análises realizadas, foi de 28% e este valor não é compatível ao encontrado na literatura para a mesma espécie que está na faixa de 35 a 50%. Para a hemicelulose o valor encontrado foi de 8% e na literatura o valor está na faixa de 17 a 19%, esta diferença pode ser proveniente do método, que usou concentração do ácido sulfúrico e temperatura menores, utilizado para a caracterização.⁵³ Em outras espécies como o *Eucalyptus grandis* composição encontrada foi de 40% para a celulose e 9% para a hemicelulose e o híbrido das espécies *Eucalyptus grandis x urophylla* a composição foi de 39% para a celulose e 10% para a hemicelulose.⁵⁴ Vale

argumentar que foram utilizadas variáveis diferentes, como o tempo e a concentração de ácidos para a caracterização química destas espécies. Apesar de observar que outras metodologias empregadas apresentam resultados diferentes, optamos por esta que foi utilizada por ser a mais empregada e completamente estabelecida no laboratório de bioprocessos da Embrapa Agroenergia. É fato que os procedimentos experimentais envolvendo matérias-primas complexas apresentam erros experimentais bastante elevados.

4.1.2 Caracterização química das biomassas pré-tratadas

O pré-tratamento ácido foi realizado para desorganizar a estrutura da madeira e remover a fração hemicelulósica. Dessa forma, após esta etapa o que se percebeu foi que o percentual de celulose aumentou e a quantidade de hemicelulose diminuiu conforme análise realizada no CLAE. O percentual de celulose disponibilizada nesta etapa do pré-tratamento foi de 32% e a de hemicelulose de 6%. Após o processo de filtragem a biomassa resultante desta etapa tem em sua composição celulose e lignina, visto que a hemicelulose foi removida.

Na etapa do pré-tratamento alcalino onde há a deslignificação da biomassa o percentual de celulose disponibilizada foi de 40% e a de hemicelulose de 2%. Dessa forma, pôde-se perceber que o eucalipto pré-tratado alcalinamente teve um aumento do percentual de celulose de 39% em relação ao estado bruto do eucalipto. Podemos comparar, por exemplo, a caracterização do bagaço de cana de açúcar que teve um percentual de celulose de 44% e que após a etapa de pré-tratamento resultou em 64% de celulose. Dessa forma, os resultados obtidos com o pré-tratamento teve um percentual de 56% de aumento da celulose.⁵⁵ Este resultado demonstra que a biomassa bagaço da cana de açúcar, por apresentar em sua estrutura menos resistência quanto ao pré-tratamento, teve um rendimento maior que a biomassa do *EU*. Com isso, apesar do resultado ter sido menor para o *EU*, fica evidente que a etapa de pré-tratamento foi eficaz e disponibilizou uma fração maior de celulose, que era o desejável, para a etapa da hidrólise enzimática.

Estudos relatam que a hidrólise ácida, com ácido concentrado a temperaturas elevadas, pode levar a dissociação da celulose.³⁰ Contudo, existem outros estudos

que apontam a eficiência em outras biomassas, como por exemplo, o bagaço da cana de açúcar e a palha de centeio, sendo importante lembrar que estes experimentos foram conduzidos em condições diferentes, como em temperaturas mais amenas e concentrações de ácidos menores. Dessa forma, durante o processo adotado, as amostras podem ter sofrido perdas dos açúcares, tanto da celulose quanto da hemicelulose, ou a degradação dos mesmos.^{56,57,58}

Na Figura 10 são apresentados os três estados (bruto, pré-tratado ácido e o pré-tratado alcalino) do eucalipto *EU*. Nota-se visivelmente que o *EU* teve uma mudança na sua composição, pois a cor em cada etapa vai sendo modificada pela remoção dos componentes como a hemicelulose no pré-tratamento ácido e a lignina no alcalino.

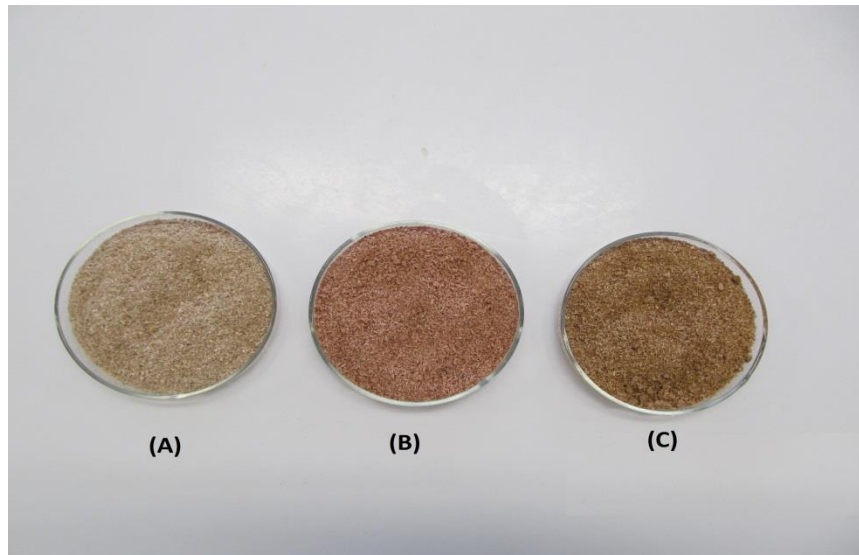


Figura 10 - Amostras de eucalipto *EU*: (A) eucalipto em seu estado bruto; (B) eucalipto após pré-tratamento ácido; (C) eucalipto após pré-tratamento ácido e seguido do alcalino.

4.2 Hidrólise enzimática

Na etapa da hidrólise enzimática, onde a celulose foi convertida a glicose, açúcar fermentável, os resultados são restritos aos pontos inicial e final, uma vez que este estudo tem como foco principal o processo de fermentação. Através do modelo matemático da equação da reta, encontrada com a curva de calibração para a glicose

no CLAE, pode-se quantificar a glicose que foi formada durante o processo.

Obteve-se com 24 horas de hidrólise enzimática 20,69 g/L de glicose no meio. De acordo com a metodologia de caracterização, o rendimento máximo esperado seria de 35,05 g/L, com isso foi observado que o rendimento médio da hidrólise foi de 20,69 g/L, atingiu-se 59%.

Esta conversão já era esperada visto que a madeira é um material muito recalcitrante quando comparado com outras biomassas, soma-se a isso o fato de que a proporção sólido/líquido em todas as etapas de processos é 1:10, o que normalmente não é encontrado na literatura que é de 1:30. Esta proporção é utilizada visando-se um processo em escala industrial.^{58,59,60}

A cristalinidade da biomassa lignocelulósica é um dos entraves para a digestibilidade enzimática, mas isso não explica a recalcitrância dos substratos lignocelulósicos. O pré-tratamento ácido seguido de alcalino diminui consideravelmente a cristalinidade deste material, pois remove as porções de hemicelulose e lignina, conforme visto nas análises da composição química. Se compararmos com o bagaço da cana de açúcar a conversão de celulose em glicose após a hidrólise enzimática é normalmente de aproximadamente 80%.⁵⁸ Outro ponto que deve ser observado é que depende, também, da dosagem de enzimas que foi estabelecido no procedimento.

4.3 Fermentação

Como comentado anteriormente, existem alguns fatores que afetam o desempenho da levedura durante a fermentação. Dentre os principais fatores que podem afetar o crescimento da levedura e a produção de etanol foram analisados a presença de inibidores e a falta de nutrientes no meio em que ocorreu a fermentação, bem como em meio contendo todas as necessidades deste microrganismo.

Dentro deste contexto será mostrado nos itens a seguir o comportamento da levedura, quanto ao seu crescimento e a sua produtividade.

4.3.1 Curva padrão de levedura

Com os resultados de peso seco das leveduras e as absorvâncias obtidas no espectrofotômetro pelas diluições construiu-se o gráfico do tipo da Figura 11 que é a curva padrão utilizada para quantificação de microrganismos. A equação da reta encontrada foi usada para calcular as concentrações do crescimento das leveduras durante o processo de fermentação.

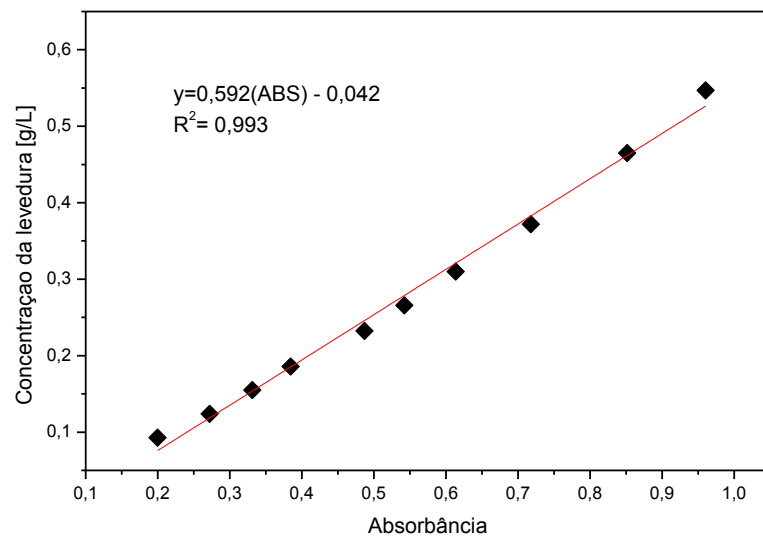


Figura 11 - Equação da reta gerada pela curva padrão. Sendo y a concentração desejada e ABS a absorvância.

Para encontrar uma equação onde o coeficiente de correlação estivesse próximo de 1, ou seja, uma correlação muito forte, o procedimento foi repetido algumas vezes até se chegar ao valor de $R^2 = 0,993$. A repetição se deu devido a necessidade de estabelecer as absorvâncias em uma faixa que fosse > 0 e < 1 , e para isso foram feitas diversas diluições do meio em que se encontrava a levedura. Este valor foi determinado para garantir que a concentração de células encontra-se na faixa linear da curva.

4.3.2 Crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Para o sucesso no desempenho de um processo fermentativo, é necessário que as características do agente fermentativo, a levedura *S. cerevisiae*, sejam observadas e respeitadas. A sobrevivência e o crescimento da levedura dependem de um adequado suprimento de nutrientes e de um ambiente físico favorável.

As fermentações deste trabalho foram realizadas nas condições ambientais necessária para o desenvolvimento das leveduras. Contudo, alguns meios não continham substratos suficientes para a manutenção das mesmas. Os gráficos com o crescimento de cada meio é demonstrado e discutido a seguir. Os resultados mostrados são os que melhores representaram a reprodutibilidade dos experimentos.

4.3.2.1 Meio sintético

Para o crescimento das leveduras é necessário um meio de cultura apropriado que simule ou até melhore a condição natural do ambiente em que se desenvolve. Um meio de cultura sintético é um substrato nutritivo capaz de permitir a nutrição e o crescimento dos microrganismos. O meio de cultura YPG 10% é um meio rico para o crescimento e desenvolvimento da levedura, assim como para a fermentação e produção de etanol, principal produto desta fermentação.

Nesse sentido, o crescimento da *S. cerevisiae* no meio sintético obteve um crescimento desejado podendo ser visto, no gráfico da Figura 12, que na fase lag o microrganismo sofre com a adaptação ao meio, mais é bem sutil. Na fase exponencial onde ocorre o crescimento na ordem de 2^n , sendo n o número de divisões, a levedura teve um crescimento expressivo. Após a fase exponencial a levedura entra na fase estacionária, não chegando à fase de declínio devido ao tempo a qual foi monitorada. Esta curva de crescimento da levedura foi avaliada e utilizada como padrão de comparação com as outras curvas de crescimento da levedura em outros meios que foram analisados.

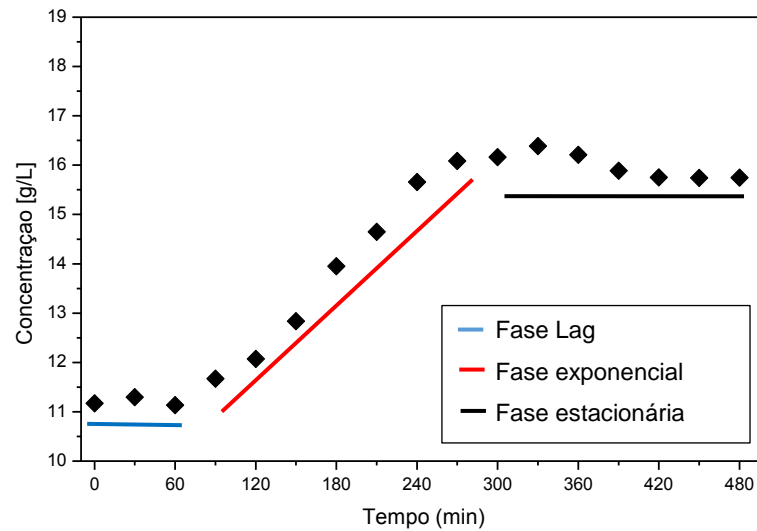


Figura 12 - Crescimento da levedura em meio sintético.

Os resultados encontrados para o meio sintético em relação ao crescimento do microrganismo são: a taxa específica de crescimento (μ) da levedura foi de $0,0017 \text{ g/h}^{-1}$ e o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) foi de $0,051 \text{ g/g}$. Estes resultados serviram de modelo para os meios que foram analisados, como segue abaixo.

4.3.2.2. Meio hidrolisado

Após o pré-tratamento e a hidrólise enzimática e com o hidrolisado suplementado com glicose (100 g/L) a fermentação teve início e seguiu conforme descrito na metodologia. Nenhum tratamento de desintoxicação, para a eliminação de inibidores, foi realizado no meio hidrolisado antes da fermentação.

Os resultados obtidos para o crescimento da levedura no meio hidrolisado são demonstrados na Figura 13, gráfico que representa o seu crescimento neste meio, e pôde-se observar que a levedura não se adaptou ao meio o que prejudicou o seu crescimento. A taxa específica de crescimento da levedura (μ) foi de $0,0005 \text{ g/h}^{-1}$ enquanto que no meio sintético a taxa foi de $\mu = 0,0017 \text{ g/h}^{-1}$, como pode-se notar a taxa do meio hidrolisado foi bem inferior a taxa do meio sintético, com isso pode-se

afirmar que há alguma interferência no desenvolvimento da levedura no meio hidrolisado. O fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) foi de 0,023 g/g, ou seja, a metade da taxa encontrada no meio sintético que foi de 0,051 g/g, confirmando, assim, a incapacidade do desenvolvimento da levedura. Observou-se que no meio sintético foi obtido um aumento de 41% na concentração de células e no meio hidrolisado o crescimento obteve um aumento de 17%.

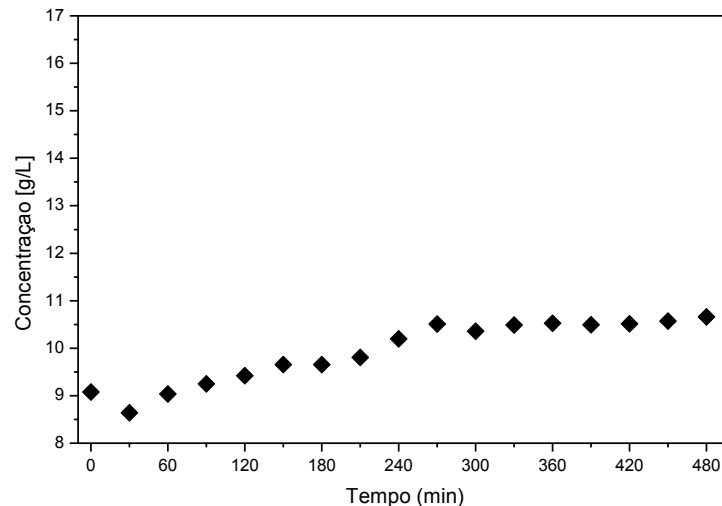


Figura 13 - Crescimento da levedura no meio hidrolisado.

A produtividade de etanol na fermentação está diretamente ligada ao crescimento das células e da concentração da massa celular, e que nos hidrolisados lignocelulósicos está relacionado, também, pelos inibidores derivados do pré-tratamento ou pela degradação dos açúcares gerados no processo.⁶¹ Neste sentido, os dados observados na fermentação levaram-nos a inferir que o crescimento foi afetado pela presença de inibidores, pois com a mesma levedura e com as mesmas condições de operação, mudando-se somente o substrato, do meio sintético que é rico em nutrientes para um meio hidrolisado, houve uma grande diferença no comportamento da levedura.

A investigação no retardo do crescimento da levedura foi realizada utilizando-se o CLAE, as amostras foram analisadas sem diluição, com tempo de retenção de 52 minutos para verificar a possibilidade da existência de algumas moléculas que estivesse interferindo no desenvolvimento da levedura. Visto que na literatura Scarlata

e Hyman⁶² demonstraram que a presença do composto HMF foi encontrada no tempo de retenção de 32,0 minutos e o furfural no tempo de retenção de 48,8 minutos, nas mesmas condições de análise que foi realizada neste estudo.

As análises realizadas no CLAE identificaram a presença dos compostos furfural e hidroximetilfurfural, que mostra o tempo de retenção para o HMF em 31,7 minutos e para o furfural de 46,7 minutos, essa diferença pode ser atribuída pela na coluna utilizada diversas vezes. Com base na figura 14, foram calculadas as suas concentrações através da curva gerada com concentrações conhecidas destes compostos. As concentrações encontradas foram de 0,026 g/L para o furfural e 0,007 g/L para o HMF. O furfural causa sobre as leveduras uma diminuição da taxa específica de crescimento e o HMF, apesar de menos tóxico também causa danos à membrana celular das leveduras, isto tem sido comprovado por diferentes estudos realizados.^{63,64}

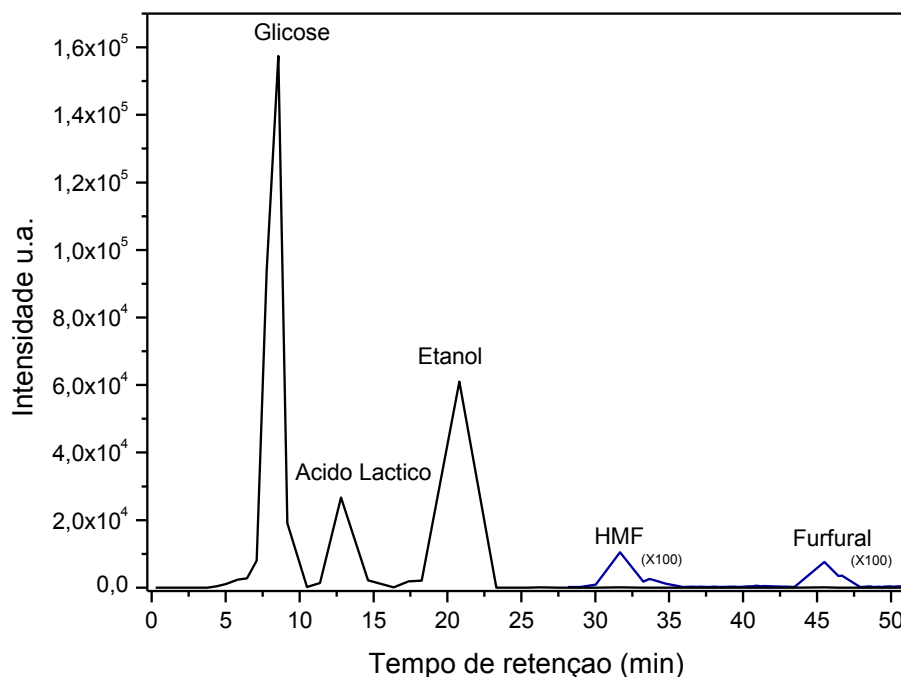


Figura 14 - Cromatograma do tempo final da fermentação do meio hidrolisado sem diluição realizado no CLAE.

4.3.2.3 Meio sintético com inibidores

Ao ser constatado a presença dos compostos furfural e HMF no meio hidrolisado e calculadas as suas devidas concentrações, descritas no item anterior, avaliou-se o comportamento da levedura durante a fermentação adicionando estes compostos ao meio sintético.

Na Figura 15 pode-se perceber que a levedura obteve um crescimento com rendimento próximo ao meio sintético sem a presença destes compostos, mas houve uma perda em suas taxas. A taxa específica de crescimento (μ) foi de $0,0011 \text{ g/h}^{-1}$ e no meio sintético o $\mu = 0,0017 \text{ g/h}^{-1}$ e o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) de $0,033 \text{ g/g}$ e para o meio sintético $Y_{X/S} = 0,051 \text{ g/g}$. Além disso, verificou-se que o aumento na concentração de células no meio sintético com a presença de inibidores foi de 28%, e se compararmos com o meio sintético puro que foi de 41% e com o meio hidrolisado que foi de 17% constatamos que houve uma queda em relação ao meio padrão, mas um aumento em relação ao meio hidrolisado. Assim, concluímos que o fator que estava impedindo o crescimento da levedura no meio hidrolisado não era somente o fato de apresentar os compostos furfural e HMF.

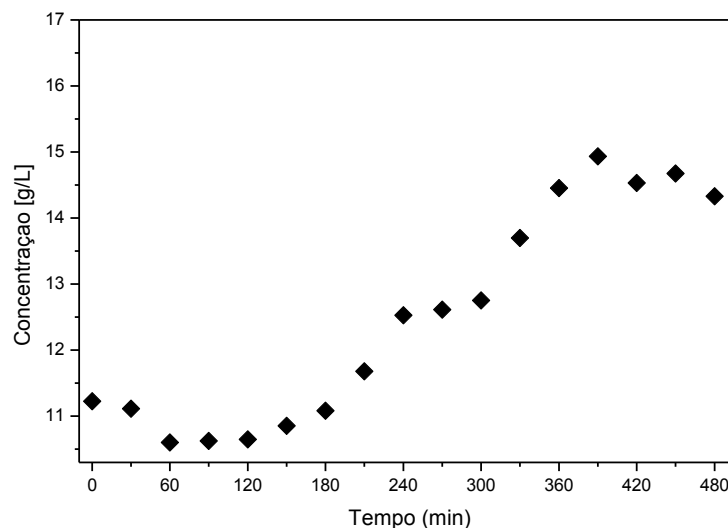


Figura 15 - Crescimento da levedura em meio sintético na presença dos compostos furfural e HMF.

Pode-se supor que o fato da levedura ter se desenvolvido, mesmo que precariamente, na presença de inibidores deve-se a concentração destes compostos

presentes no hidrolisado serem muito baixas, pois na literatura a concentração para inibir o crescimento de microrganismos pode variar, dependendo da biomassa e do pré-tratamento que foi submetido.⁶⁵ Para o furfural a concentração encontrada foi de 0,4 g/L para o abeto (árvore conífera do gênero *Abies* da família *Pinaceae*)⁶⁶ enquanto que para a cana de açúcar e seu bagaço 2,22 g/L.⁶⁷ Para o HMF a menor concentração encontrada foi de 0,06 g/L para a palha de milho⁶⁸ e a maior foi de 3,0 g/L para o abeto.⁶⁹

4.3.2.4 Meio hidrolisado suplementado

Diante dos dados da taxa de crescimento (μ) e o fator de conversão ($Y_{X/S}$) percebeu-se que há sim uma interferência significativa no crescimento do microrganismo na presença destes inibidores, mas ela não é tão alta como no hidrolisado. Dessa forma, suplementou-se o hidrolisado com sais inorgânicos que os microrganismos necessitam para um crescimento satisfatório, tendo este suplemento as condições mínimas para o desenvolvimento do microrganismo. De acordo com a metodologia descrita as alíquotas de hidrolisado foram suplementadas e em seguida a levedura foi inoculada no meio.

Com os resultados obtidos gerou-se o gráfico da Figura 16 que demonstrou o crescimento da levedura, com a presença dos sais. A levedura se comportou de maneira eficiente, mesmo em no meio hidrolisado.

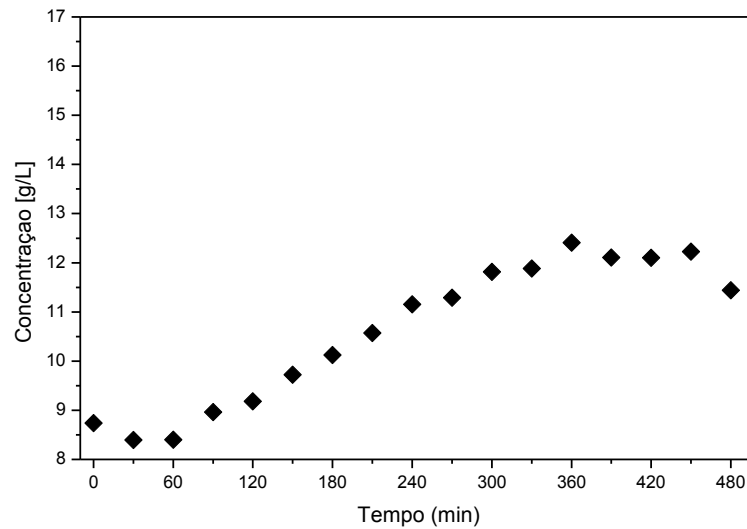


Figura 16 - Crescimento da levedura no meio hidrolisado suplementado com sais inorgânicos.

As taxas encontradas neste procedimento foram $\mu = 0,0015 \text{ g/h}^{-1}$ e $Y_{x/s} = 0,028 \text{ g/g}$. Nota-se que a taxa específica de crescimento (μ) foi bem próxima ao do meio sintético que é de $\mu = 0,0017 \text{ g/h}^{-1}$. Contudo, o fator de conversão do substrato em celular não foi expressivo, pois para o meio sintético o valor foi de $Y_{x/s} = 0,051 \text{ g/g}$ e para o meio hidrolisado foi de $Y_{x/s} = 0,023 \text{ g/g}$. Dessa forma, o fator de conversão não teve uma melhora significativa com a presença dos nutrientes acrescidos no meio hidrolisado.

Ao analisarmos o crescimento das células da levedura no meio hidrolisado suplementado observou-se que houve um aumento na concentração de massa de 31% e o meio hidrolisado o percentual foi de 17%, o que demonstrou um crescimento próximo ao do meio sintético que foi de 41%, e superior ao meio hidrolisado com inibidores. Dessa forma, podemos concluir que o meio hidrolisado do *EU* tem uma carência de nutrientes que interferem no crescimento da levedura, mas que também possui compostos que inibem o desenvolvimento deste microrganismo.

4.3.3 Consumo do substrato e a produção de etanol

A concentração de substrato, pH, tempo e temperatura, presença de contaminantes são fatores que podem afetar o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar em etanol. Geralmente, há queda na eficiência do processo fermentativo ou na qualidade do produto final.⁷⁰

Com as amostras, do meio sintético, meio hidrolisado, meio sintético com inibidores e meio hidrolisado suplementado, das fermentações previamente diluídas e passadas no CLAE foram calculadas as concentrações do substrato (glicose) e do produto (etanol) através da curva de calibração. A curva de calibração, para a glicose e para o etanol, foi preparada com uma concentração conhecida de 5 g/L, que é o limite de detecção do equipamento.

A seguir serão apresentados os rendimentos da fermentação nos diferentes procedimentos que foram analisados.

4.3.3.1 Meio sintético

As análises realizadas no CLAE demonstraram que o comportamento da levedura condiz com o seu crescimento, pois para que haja seu crescimento a mesma necessita de substratos, o que, conseqüentemente, leva à formação de produtos. Isso ocorreu, pois o meio de fermentação, meio sintético, forneceu os nutrientes necessários favorecendo tanto o crescimento microbiano quanto a formação do produto.⁷¹

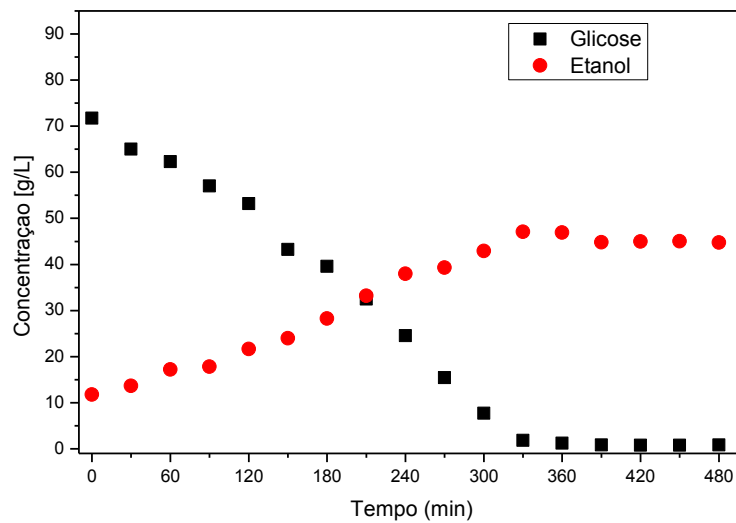


Figura 17 - Consumo de glicose e produção de etanol no meio sintético.

Os resultados obtidos para o consumo de substrato e da produção do produto estão demonstrados no gráfico da Figura 17. O fator de conversão de substrato em produto encontrado foi de ($Y_{P/S}$) 0,51 g/g e a eficiência de fermentação (E) foi de 100%. Demonstrando que todo o substrato, a glicose, foi consumido e transformado em produto, o etanol, pelo processo biológico da levedura.

Como o meio sintético é um meio rico em nutrientes para o desenvolvimento da levedura os resultados obtidos foram o desejado, pois as condições eram as mais favoráveis para este rendimento. Ao verificarmos o comportamento da levedura durante seu crescimento observou-se um aumento da concentração de células de 41% e que a mesma passou pelas fases de crescimento de maneira bem definida. E, além disso, a quantidade de glicose no final da fermentação foi toda consumida e teve uma concentração igual a zero, o que gerou um rendimento de 100% de produto.

4.3.3.2 Meio hidrolisado

Ao analisarmos os resultados do meio hidrolisado, verificou-se que o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi de 0,43 g/g e a eficiência de fermentação $E= 84\%$. Levando em conta que para a fermentação ser produtiva há a necessidade

de que a levedura se desenvolva satisfatoriamente no meio em que esta ocorrendo o processo, observou-se que no meio sintético a levedura obteve sua produção em 100%, sendo compatível com o consumo de glicose que foi toda convertida em etanol, e que o seu crescimento foi bem definido.

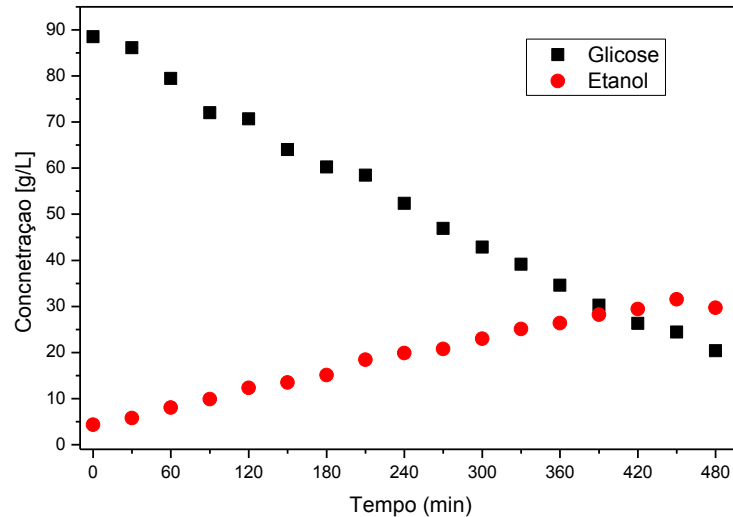


Figura 18 - Consumo de glicose e formação de etanol no meio hidrolisado.

Os valores encontrados para o meio sintético, $Y_{P/S} = 0,51$ g/g e $E = 100\%$, em termos numéricos não ficaram muito acima dos resultados do meio hidrolisado, mas pôde-se observar no gráfico da figura 18 que a glicose não foi totalmente consumida e que a produção de etanol foi baixa, esta diferença de 16% na produção de etanol pode acarretar perdas significativas nos rendimento financeiros das indústrias. Isso pode estar atribuído ao crescimento da levedura no meio hidrolisado, que obteve uma taxa $\mu = 0,0005$ g/h⁻¹, enquanto que no meio sintético esta taxa foi de $\mu = 0,0017$ g/h⁻¹. O não crescimento da levedura afetou a produção de etanol, contudo houve uma produção de etanol, muito inferior ao meio sintético.

4.3.3.3 Meio sintético com inibidores

Nas etapas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, especialmente quando é empregada a etapa com ácido, são gerados ou liberados alguns compostos que têm

um efeito inibidor na fermentação. Esses compostos podem trazer prejuízo à taxa de crescimento e conseqüentemente a produtividade.⁶⁴

Os resultados do meio sintético com a presença dos compostos furfural e HMF foram bem próximos aos resultados do meio sintético puro. O fator de conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$ foi de 0,47 g/g e sua eficiência de fermentação $E = 92\%$. Os dados estão representados no gráfico da Figura 19. Contudo, é notável que a levedura não apresentou uma boa conversão, como no meio sintético puro, cujo os resultados são $Y_{P/S} = 0,51$ g/g e $E = 100\%$, e isso pode ser atribuído ao estresse que foi submetido pela presença destes compostos.

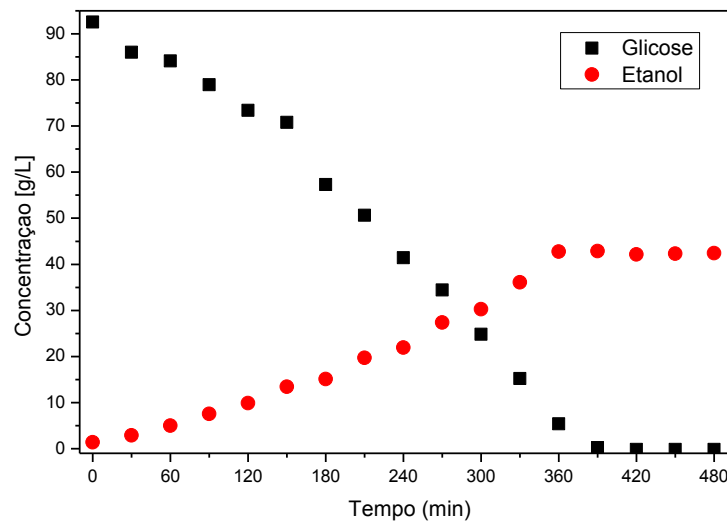


Figura 19 - Consumo de glicose e produção de etanol no meio sintético na presença de inibidores.

Para a levedura, *S. cerevisiae*, usada na fermentação o furfural tem efeito negativo na taxa específica de crescimento, no rendimento de massa celular e na produção de etanol, além de diminuir a viabilidade da levedura.⁶⁵ Estudos observaram também, para a *S. cerevisiae*, que na presença de furfural e HMF, embora o rendimento de biomassa sobre o substrato seja menor, o rendimento de etanol é maior.^{65,63}

Com efeito, isto pode ser analisado quando observamos os valores dos fatores de conversão de substrato em células para o meio sintético puro e para o meio sintético com os inibidores, $Y_{X/S} = 0,051$ g/g e $Y_{X/S} = 0,033$ g/g respectivamente, e as taxas de eficiência de fermentação, $E = 100\%$ e $E = 92\%$. Dessa forma, verificou-se

que houve uma diminuição na via metabólica da levedura, o que acarretou uma queda na concentração final do produto no meio.

4.3.3.4 Meio hidrolisado suplementado

Como foi relatado anteriormente, para a realização da fermentação, é necessário que seja preparado um meio, que favoreça tanto o crescimento microbiano quanto a formação do produto. Conseqüentemente, a falta de nutrientes básicos para o desenvolvimento da levedura pode afetar o seu crescimento e a produção de etanol.

De acordo com os estudos citados acima, a falta de nutrientes pode causar um prejuízo na formação do produto, e isto pôde ser visto na produção de etanol no meio hidrolisado puro, onde o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi de 0,43 g/g e a eficiência de fermentação $E = 84\%$. Os dados gerados pela fermentação do meio hidrolisado suplementado demonstrados no gráfico da Figura 20 nos mostram que a levedura se desenvolveu de forma eficiente e os valores encontrados para o fator de conversão de substrato em produto foi de 0,505 g/g e sua eficiência de 99%. Comprovando, assim, que há uma carência de nutrientes no meio hidrolisado de *EU* e que para uma fermentação viável é importante que haja uma suplementação do meio resultante das etapas que precedem a fermentação.

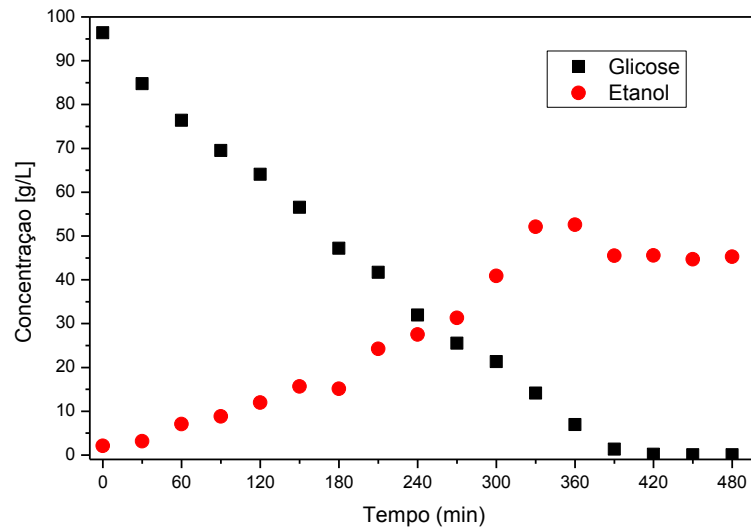


Figura 20 - Consumo de glicose e produção de etanol no meio hidrolisado suplementado.

Dessa forma, os nutrientes são necessários para o bom desenvolvimento da fermentação, afetando a velocidade e a multiplicação da levedura. A concentração adequada destes nutrientes no meio é muito importante, pois se estiverem presentes em quantidades insuficientes ou exageradas, podem refletir de forma negativa sobre o processo fermentativo. E a falta de nutrientes pode acarretar consideravelmente o rendimento de etanol e a viabilidade celular da levedura.⁷⁰

Estudos apontam que os nutrientes participam do metabolismo da levedura como ativadores das enzimas. No caso, quando uma quantidade de nutrientes é insuficiente, a levedura reproduz e conduz a fermentação lentamente ou mesmo sua reprodução é impossível.⁷² E isso constata o que foi analisado nos meios onde a presença de nutrientes era satisfatória. No meio hidrolisado a falta dos nutrientes prejudicou o desenvolvimento da levedura e, conseqüentemente, a produção de etanol.

5 – Conclusões e Perspectivas

A madeira de eucalipto da espécie *Eucalyptus urophylla* tem potencial para a produção de etanol lignocelulósico, pois a quantidade de celulose presente em sua composição é bastante significativa. Contudo, é mais explorada em outros setores, como a construção e a produção de celulose para a fabricação de papel, e muito pouco explorada como fonte de açúcares fermentáveis.⁵⁴

A caracterização química do *EU* foi essencial para o desenvolvimento do presente trabalho e os resultados após a etapa de pré-tratamento foram abaixo dos encontrados na literatura. O percentual de celulose disponibilizado após o pré-tratamento alcalino para a celulose foi de 40% e para a hemicelulose de 2%. Dessa forma, houve um aumento de 39% da celulose em relação ao seu estado bruto. Este resultado demonstra que a etapa de pré-tratamento foi eficaz, pois disponibilizou uma fração maior de celulose para o processo de hidrólise enzimática. Nesta etapa a conversão de celulose em glicose foi de 59%.

O processo de fermentação é uma parte de extrema importância na obtenção de etanol lignocelulósico. Para que haja um crescimento microbiano suficientemente bom, o meio de cultura deve conter os nutrientes em quantidades e proporções corretas para o crescimento e manutenção dos microrganismos, além disso, características como temperatura, pH e oxigênio devem estar de acordo com as necessidades do microrganismo.

A fermentação do meio hidrolisado foi a que obteve os menores índices quando comparado aos outros meios. O meio sintético serviu de padrão para analisar primeiramente o meio hidrolisado puro. Os valores encontrados para os parâmetros analisados foram: $\mu = 0,0017 \text{ g/h}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0,051 \text{ g/g}$, $Y_{P/S} = 0,51 \text{ g/g}$ e $E = 100\%$.

Ao verificar que o comportamento da levedura no meio hidrolisado, através dos parâmetros $\mu = 0,0005 \text{ g/h}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0,023 \text{ g/g}$, $Y_{P/S} = 0,43 \text{ g/g}$ e $E = 84\%$, comparando com o meio sintético, constatou-se que algum fator impede o desenvolvimento da levedura, neste meio. E que esta diferença no rendimento da fermentação, 16%, acarreta em perdas significativas para o setor de produção de etanol lignocelulósico, nos rendimentos das indústrias.

As análises do meio hidrolisado realizadas no CLAE mostraram a presença dos compostos furfural e HMF, mesmo que em concentrações baixas. Após detectar estes compostos foi feita a fermentação em um meio sintético com os inibidores para avaliar o comportamento da levedura. Os valores encontrados foram: $\mu = 0,0011 \text{ g/h}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0,033 \text{ g/g}$, $Y_{P/S} = 0,47 \text{ g/g}$ e $E = 92\%$, e notou-se que apesar da melhora em relação ao meio hidrolisado a levedura não apresentou uma boa conversão, ao compararmos com o meio sintético, e isso pode ser ao fato de que a levedura sofreu na presença dos inibidores.

Ao analisar o comportamento da levedura no meio hidrolisado suplementado percebeu-se que o seu desenvolvimento foi melhor do que do meio hidrolisado sem o suplemento, como mostra os resultados $\mu = 0,0015 \text{ g/h}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0,028 \text{ g/g}$, $Y_{P/S} = 0,505 \text{ g/g}$ e $E = 99\%$. Mesmo com os sais minerais no meio hidrolisado a levedura teve um fator de conversão muito abaixo do meio sintético e seu rendimento não foi total.

Como demonstrado acima, pôde-se concluir que a presença de inibidores e a ausência de nutrientes no meio hidrolisado afetam o crescimento da levedura e, conseqüentemente, a produção de etanol. Comprovando, como citado anteriormente, que há a ação de inibidores neste processo, que causam perdas significativas no rendimento e um tempo maior de reação.

Assim, visando a melhoria do processo e um rendimento significativo do biocombustível sugere-se estudar mais detalhadamente a etapa de fermentação do hidrolisado de eucalipto. Investigando e analisando os hidrolisados quanto a sua composição química e a presença de compostos que inibem a fermentação.

Referências

- [1] Cortez, L. A. B.; Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para a produtividade e sustentabilidade. Ed. *Blucher*, **2010**. 1ed.
- [2] Santos, F. A.; Queiróz, J. H.; Colodette, J. L.; Fernandes, S. A.; Guimarães, V. M.; Rezende, S. T.; *Quim. Nova* **2012** XY, 1.
- [3] <http://www.cerpch.unifei.edu.br/biomassa.php>, Acesso: 22/01/2013
- [4] Brito, J. O.; *Estud. Av.* **2007**, 21, 185.
- [5] Tuoto, M.; Levantamento sobre a geração de resíduos provenientes da atividade madeireira e proposição de diretrizes para políticas, normas e condutas técnicas para promover o seu uso adequado. Ministério do Meio Ambiente, **2009**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/164/_publicacao/164_publicacao10012011032535.pdf> - Acesso: 23/01/2013.
- [6] Santos, A.R.A.; Lopes, G.F.; Pereira, M.A.; Gosttsaltall, S.H.; Calvo, S.A.O.; Energia da Biomassa. Universidade de São Paulo, **1999**. Disponível em: <<http://www.cepa.if.usp.br/energia/energia1999/Grupo1B/ebiomassa.html>> - Acesso: 23/01/2013.
- [7] Tradelink-group. Briquete: Resíduos de madeira gera energia. Biotex Briquete, **2010**. Disponível em: <<http://www.biotexbriquetes.com/wp-content/themes/biotex/files/Materia%20-%20Tradelink%20Briquettes.pdf>>- Acesso: 23/01/2013.
- [8] Rocha, J.; Buckeridge, M.; *New Scientist* **2009**, 202, 26.
- [9] Sun, Y.; Cheng, J.; *Bioresour. Technol.* **2002**, 83, 1.
- [10] Tortora, L.; Funk, B.; Case, C. *Microbiologia*, Ed. *Artmed*, **2005**, 8 ed.
- [11] Assunção, F. C. R.; Química verde no Brasil 2010-2030. Ed. rev e atual. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, **2010**, 17.
- [12] Cascone, R. *Hidrocarbon Process., Int. Ed.* **2007**, 95.
- [13] Oliveira, C. W. A.; Boletim regional, urbano e ambiental. *Ipea*, **2009**, 3, 53.
- [14] Bastos, V. D.; *BNDES Setorial*, **2007**, 25, 5.
- [15] Gomide, J. L.; Neto, H. F.; Regazzi, A. J. R. *Árvore*, **2010**, 34, 339.
- [16] Klock, U.; Muniz, G. I. B.; Hernandez, J. A.; Andrade, A. S.;. *Química da madeira*, **2005**, 3, 1.
- [17] Pereira, H.; Graça, J.; Rodrigues, J.C.;. *Press Oxford*: **2003**, 53.
- [18] Cortez, L. A. B.; Lora, E. E. S.; Gómez, E. O. *Biomassa para energia*. 2008, Ed. Unicamp, 15.
- [19] Goldemberg, J.; Luncon, O.; *Estud. Av.* **2007**, 21, 7.
- [20] Lee, J.; *J. Biotechnol* **1997**, 56, 1.
- [21] Maiche, R.; Huber, C. *Rev. Thema*, **2010**, 07, 1.

- [22] Ramos, L. P. *Quim. Nova*, **2003**, 26, 863.
- [23] Morais, S. A. L.; Nascimento, E. A.; Melo, D. C. *Rev. Árvore*, **2005**, 29, 461.
- [24] Chandra, R. P.; Bura, R.; Mabee, W. E.; Berlin, A.; Pan, X.; Saddler, J. N.; *Biochem. Eng. Biotechnol.***2007**, 108, 67.
- [25] Zhang, Y. H. P.; Ding, S. Y.; Mielenz J. R.; Cui, J. B.; Elander, R. T.; Laser, M.; Himmel, M. E.; McMillan, J. R.; Lynd, L. R.; *Biotechnol Bioeng.* **2007**, 97, 214.
- [26] Zhao, H.; Jones, C. L.; Baker, G. A.; Xia, S.; Olubajo, O.; Person, V. N.; *J. Biotechnol.* **2009**, 139, 47.
- [27] Kilpeläinen, I.; Xie, H.; King, A.; Granstrom, M.; Heikkinen, S.; Argyropoulos, D. S.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 9142.
- [28] Galbe, M.; Zacchi, G.; *Biochem. Eng. Biotechnol* **2007**, 108, 41.
- [29] Fort, D. A.; Remsing, R. C.; swatloski, R. P.; Moyna, P.; Moyna, G.; Rogers, R. D.; *Green Chem* **2007**, 9, 63.
- [30] Schuchardt, U. Ribeiro, M. L. *Quim. Nova*, **2001**, 24, 247.
- [31] Silva, A. S.; Silva, F. L. H.; Carvalho, M. W. N. C.; Pereira, K. R. O. *Quim. Nova*, **2012**, 35, 683.
- [32] Amarasekara, A.; Owereh, O. S.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, xxx, A.
- [33] Lee, S. H.; Doherty, T. V.; Linhardt, R. J.; Dordick, J. S.; *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, 102, 1368.
- [34] Ramos, L.P.; Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. Universidade Federal de São Carlos, **2000**. Disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/lamam/disciplinas_arquivos/res/artigo_pretratamento.pdf> - Acesso: 23/01/2013.
- [35] Ogeda, T. L.; Petri, F. S.; *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 7, 1549-1558, 2010.
- [36] Laluce, C.; Schenberg, A.C.G.; Gallardo, J.C.M.; Coradello, L.F.C.; Sponchiado, S.R.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, 166, 1908.
- [37] Luz, L.M.; Álcool Combustível. InfoEscola, **2007**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/quimica/alcool-combustivel>> - Acesso:15/06/2012
- [38] Taherzadeh, M.J.; Karimi, K.; *BioResources* **2007**, 2, 472.
- [39] Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M.; Princípios de Bioquímica, Ed. *Sarvier*, **2006**, 4ed.
- [40] Silva, J. A. Damasceno, B. P. G. L.; Silva, F. L. H.; Madruga, M. S.; Santana, D. P. *Quim. Nova*, **2008**, 31, 1073.
- [41] Venturini Filho, W.G.; Tecnologia de bebidas. Ed. *Edgard Blücher*, **2005**, 525.
- [42] Tibayrenc, P.; Belloy, L.P.; Ghommidh, C.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.***2011**, 38, 687.
- [43] Sánchez, O.J.; Cardona, C.A.; *Bioresour. Technol* **2008**, 99, 5270.
- [44] <http://blogs.estadao.com.br/pesquisa-agora>. Acesso: 30/11/2013.

- [45] Palmqvist, E.; Hågerdal, B.H.; *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 25.
- [46] Moon, J.; Liu, Z.L.; *Enz. and Microbial Technol.* **2012**, *50*, 115.
- [47] Caetano, A.C.G.; Madaleno, L.L.; *Ciência & Tecnologia* **2011**, *2*, 27.
- [48] Olea, E.H.; Carrillo, E.P.; Saldívar, S.O.S.; *Bioresour. Technol.* **2012**, 119.
- [49] Bellido, C.; Bolado, S.; Coca, M.; Lucas, S.; Bendito, G.G.; Cubero, M.T.G.; *Bioresour Technol.* **2011**, *102*, 10869.
- [50] Zhao, X.Q.; Bai, F.W.; *J. of Biotechnol.* **2009**, *144*, 23.
- [51] Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Chemmons, L.M.; Macdonald, K.D.; Bufton, A.W.J. *Adv. Genet.* **1953**, *5*, 141.
- [52] Ilha, E. C.; Bertoldi, F. C.; Reis, V. D. A.; Sant'Anna, E.. *Embrapa Pantanal*, **2008**, *84*, 1
- [53] Mokfienski, A. ; Gomide, J. L. Colóquio Internacional sobre Celulose Kraft de Eucalipto. **2003**, *Único*, 5.
- [54] Lima, M. A.; Lavorente, G. B.; Silva, H. KP.; Bragatto, J.; Rezende, C. A; Bernardinelli, O. D.; Azevedo, E. R.; Gomez, L. D.; McQueen-Mason, S. J.; Labate, C. A.; Polikarpov, I. *Biotechnol Biofuels* **2013**, *6*, 75.
- [55] Fugita, T. P. L. Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, **2010**.
- [56] Perez-Cantu, L.; Schreiber, A.; Schütt, F.; Saake, B.; Kirsch, C.; Smirnova, I. *Bioresour. Technol.*, **2013**, *142*, 428.
- [57] Gouveia, E. R.; Nascimento, R. T.; Souto-Maior, A. M. *Quim. Nova*, **2009**, *6*, 1500.
- [58] Gao, Y.; Xu, J.; Zhang, Y.; Yu, Q.; Yuan, Z.; Liu, Y. *Bioresour. Technol*, **2013**, *144*, 396.
- [59] Pereira, J. C. D.; Sturion, J. A.; Higa, A. R.; Shimizu, J. Y. *Embrapa Floresta*, **2000**, *38*, 113.
- [60] Perovano, N. F.; Silva, K. F. S; López, A. M. Q. *Biol. Sci.*, **2011**, *33*, 427.
- [61] Palmqvist, E.; Hahn-Hågerdal, B. *Bioresour. Technol.*, **2000**, *74*, 17.
- [62] Scarlata, C. J.; Hyman, D. A. *J. Chromatogr. A*, **2010**, *1217*, 2082.
- [63] Taheezadeh, M. J.; Gustafsson, L.; Niklasson, C.; Lidén, G.; *J. Biosci Bioeng.* 1999, *87*, 169.
- [64] Almeida, J. RM.; Modig, T.; Petersson, A.; Hahn-Hågerdal, B.; Lidén, G.; Gorwa-Grauslund, M. F.; *J Chem Technol Biotechnol.* **2007**, *82*, 340.
- [65] Almeida, J. RM.; Berilsson, M.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Gorsich, S.; Lidén, G. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2009**, *82*, 625.
- [66] Rudolf, A.; Galbe, M.; Lidén, G. *Appl Biochem Biotechnol* **2004**, *114*, 601.
- [67] Neureiter, M.; Danner, H.; Thomasser, C.; Saidi, B.; Braun, R. *Appl Biochem Biotechnol.* **2002**, *98*, 49.
- [68] Öhgren, K.; Galbe, M.; Zacchi, G. *Appl Biochem Biotechnol.* **2005**, *124*, 1055.

- [69] Rudolf, A.; Alkasrawi, M.; Zacchi, G.; Lidén, G. *Enz Microb Technol.* **2005**, 37, 195.
- [70] Souza, J. L. U.; Monterio, R. A. B. *Rev. Eng. Fazu*, **2011**, 8, 100.
- [71] Schmidell, W; Lima, U; Aquarone, E; Borzani, W. *Biotechnologia industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: E. Blücher, **2001**. 2.
- [72] Kotarska, K.; Czuprynski, B.; Klosowski, G. *J. Food Eng.* **2006**, 77, 965.