



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SHEILA MARIM RAKSA PETENUCCI

***PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Zymomonas mobilis* A
PARTIR DE HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS EM
DIFERENTES PROCESSOS FERMENTATIVOS***

Londrina
2017

SHEILA MARIM RAKSA PETENUCI

***PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Zymomonas mobilis* A
PARTIR DE HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS EM
DIFERENTES PROCESSOS FERMENTATIVOS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Josiane Alessandra Vignoli

Coorientador: Prof. Dr. Doumit Camilios Neto

Londrina
2017

SHEILA MARIM RAKSA PETENUCCI

***PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Zymomonas mobilis* A PARTIR DE
HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS EM DIFERENTES
PROCESSOS FERMENTATIVOS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Josiane Alessandra Vignoli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Coorientador: Prof. Dr. Doumit Camilios Neto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Alessandra Machado Baron
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Londrina, 22 de setembro de 2017

DEDICO

À Deus, meu esposo e meus filhos, por todo amor e carinho

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido saúde para alcançar os meus objetivos;

À Professora Doutora Josiane Alessandra Vignoli, pela orientação, aprendizado científico e profissional, busca por estrutura, recursos e especialmente pela oportunidade e confiança. Serei eternamente grata pela colaboração e atenção;

Ao meu coorientador Professor Doutor Doumit Camillos Neto pela orientação, ensinamentos e acompanhamento durante todas as fases de elaboração dessa dissertação;

Às mestrandas Mayara Alencar de Almeida e Karen Stephanie pelo suporte, carinho, parceria, dedicação e auxílio no desenvolvimento experimental desse trabalho;

Aos meus queridos pais Albino e Leonor, por todos os esforços, dedicação incondicional e ensinamentos;

Ao meu esposo Bruno e aos meus filhos Benício e Giovana pelo incentivo e compreensão da minha ausência;

À Universidade Estadual de Londrina por proporcionar um Programa de Pós-Graduação de qualidade e gratuito;

Aos colaboradores (técnicos e docentes) do departamento de Bioquímica e Biotecnologia pela disponibilidade e atenção dispensada durante o período.

PETENUCCI, Sheila Marim Raksa. **Produção de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de hidrolisados lignocelulósicos em diferentes processos fermentativos.** 2017, 61 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A crescente demanda energética mundial e a dependência pelos combustíveis fósseis evidenciam a necessidade urgente de desenvolvimento de tecnologias alternativas para obtenção de energia sustentável. Desta forma, as tecnologias de obtenção de biocombustíveis de segunda geração, com destaque para o etanol proveniente de biomassa lignocelulósica, estão em ampla escala de estudo. Neste contexto, a substituição parcial dos combustíveis fósseis por biocombustíveis já é uma realidade e está em grande evidência. Assim, a dissertação teve como objetivo estudar a produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* CP4, proveniente da substituição parcial dos meios de cultivo por hidrolisados de resíduos lignocelulósicos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz) através de diferentes processos fermentativos (fermentação submersa, fermentação submersa com suporte sólido e fermentação em estado sólido). O bagaço de cana e a casca de arroz foram moídos, hidrolisados com solução de ácido sulfúrico 8 % (m/m), por 30 minutos a 121 °C/1 ATM, separados por centrifugação e o hidrolisado obtido neutralizado com hidróxido de amônio e utilizado como substituinte parcial do meio de fermentação para produção de etanol. Os sólidos residuais da hidrólise, assim como algodão foram utilizados como suporte sólido nas fermentações do tipo sólida e submersa com suporte sólido. As fermentações submersas com presença de suporte sólido, tanto algodão como sólido remanescente da hidrólise, apresentaram um incremento estatisticamente significativo em relação às fermentações submersas e fermentações em estado sólido. Assim, fermentações submersas com presença de suporte sólido apresentaram um potencial para produção de etanol por *Zymomonas mobilis*, principalmente quando estas utilizam os sólidos remanescentes de hidrólise de resíduos lignocelulósicos.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Casca de arroz. Fermentação submersa. Fermentação em estado sólido. Suporte sólido.

PETENUCCI, Sheila Marim Raksa. **Ethanol production by *Zymomonas mobilis* from lignocellulosic hydrolysates in different fermentation process.** 2017, 61 pp. Dissertation (Master of Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Increasing global energy demand and dependence on fossil fuels underscore the urgent need to develop alternative technologies for sustainable energy. In this way, technologies for obtaining second generation biofuels, with emphasis on ethanol from lignocellulosic biomass, has been researched in a large scale and in a smaller scale of development and implantation. In this context, the partial substitution of fossil fuels for biofuels is already a reality and is in great evidence. Thus, the objective of the present dissertation was to study the production of second generation ethanol by *Zymomonas mobilis* CP4, through partial substitution of the culture media by hydrolysates of lignocellulosics residues (e.g., sugar cane bagasse and rice husk) through different fermentation processes (submerged fermentation, submerged fermentation with solid support and solid-state fermentation). The sugar cane bagasse and the rice husk were grounded, hydrolyzed with 8 % sulfuric acid solution (w/w) , for 30 minutes at 121 °C/ 1 ATM, separated by centrifugation and the hydrolysate obtained was neutralized with ammonium hydroxide and used as a substituent of the fermentation medium for ethanol production. The residual solid from the hydrolysis as well as cotton were used as solid support for solid-state fermentation and submerged fermentation with solid support. The submerged fermentations with presence of solid support, with both cotton and solid remaining from the hydrolysis, presented a statistically significant increase in relation to submerged fermentations and solid-state fermentations. Thus, submerged fermentations with solid support present a potential for ethanol production by *Zymomonas mobilis*, especially when they use the remaining solids of hydrolysis of lignocellulosic residues.

Key-words: Sugar cane bagasse. Rice husk. Submerged fermentation. Solid state fermentation. Solid support.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Materiais lignocelulósicos: estrutura e principais componentes.....	13
Figura 2 -	Estrutura Química da (A) Celulose e (B) Hemicelulose.....	14
Figura 3 -	Estrutura Química da Lignina.....	15
Figura 4 -	Bagaço de cana-de-açúcar	16
Figura 5 -	Casca de Arroz.	17
Figura 6 -	Efeito do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.	19
Figura 7 -	Vias Biossintéticas de produção de etanol por <i>Zymomonas mobilis</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
Figura 8.	Fluxograma geral do processo de produção de etano a partir de resíduos lignocelulósicos.	33
Figura 9 -	Avaliação da biomassa de <i>Zymomonas mobilis</i> produzida por fermentações submersas na presença e ausência de hidrolisado em duas concentrações de nitrogênio.	40
Figura 10 -	Avaliação da produção de etanol por <i>Zymomonas mobilis</i> em fermentações submersas na presença e ausência de hidrolisado e em duas concentrações de nitrogênio.	41
Figura 11 -	Avaliação da produção de etanol por <i>Zymomonas mobilis</i> , por diferentes processos fermentativos, utilizando meio de cultivo parcialmente substituído por hidrolisado de casca de arroz.....	42
Figura 12 -	Avaliação da produção de etanol por <i>Zymomonas mobilis</i> , por diferentes processos fermentativos, utilizando meio de cultivo parcialmente substituído por hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.	43
Figura 13 -	Avaliação da produção de etanol a partir de hidrolisado ácido de casca de arroz utilizando remanescente sólido da hidrólise como substrato sólido por fermentações em estado sólido e submersa com presença de substrato sólido.	44
Figura 14 -	Avaliação da produção de etanol a partir de hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar utilizando remanescente sólido da hidrólise como substrato sólido por fermentações em estado sólido e submersa com presença de substrato sólido.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	10
2.1	OBJETIVO GERAL	10
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO E RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	11
3.2	PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	17
3.3	<i>ZYMONAS MOBILIS</i> COMO PRODUTORA DE ETANOL POR FERMENTAÇÃO	20
3.4	PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	CASCA DE ARROZ.....	25
4.2	BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	26
4.3	MICROORGANISMO	26
4.4	MEIO DE PRESERVAÇÃO DA <i>Z. MOBILIS</i>	26
4.5	PRÉ-INÓCULO E INÓCULO: COMPOSIÇÃO DO MEIO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	27
4.6	HIDRÓLISE ÁCIDA	27
4.6.	<i>HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR</i>	28
4.7	FERMENTAÇÕES.....	28
4.7.1	<i>AVALIAÇÃO DO EFEITO DO HIDROLISADO E DO EXCESSO DE SULFATO DE AMÔNIO NA PRODUÇÃO DE ETANOL- FERMENTAÇÕES SUBMERSAS</i>	29
4.7.2	<i>AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROCESSOS FERMENTATIVOS: FERMENTAÇÃO SUBMERSA, FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E FERMENTAÇÃO SUBMERSA NA PRESENÇA DE UM SUPORTE SÓLIDO – ALGODÃO</i>	30

4.7.3	<i>AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROCESSOS FERMENTATIVOS COM DIFERENTES SUPORTES SÓLIDOS</i>	31
4.8	DETERMINAÇÃO DE ETANOL.....	34
4.9	DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DE SOMOGYI-NELSON.....	34
4.10	DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS PELO MÉTODO BRIX.....	35
4.11	DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS PELO MÉTODO DE FENOL-SULFÚRICO.....	35
4.12	DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA	35
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	HIDRÓLISE ÁCIDA DA CASCA DE ARROZ.....	36
5.2	HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	39
5.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DO MEIO DE CULTIVO POR HIDROLISADO ÁCIDO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ETANOL POR <i>ZYMOMONAS MOBILIS</i>	39
5.4	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DO MEIO DE CULTIVO POR HIDROLISADO ÁCIDO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS POR DIFERENTES PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	41
5.5	PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO ÁCIDO DE CASCA DE ARROZ UTILIZANDO REMANESCENTE SÓLIDO DA HIDRÓLISE COMO SUBSTRATO SÓLIDO POR FERMENTAÇÕES EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA COM PRESENÇA DE SUBSTRATO SÓLIDO	44
5.6	PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO ÁCIDO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO REMANESCENTE SÓLIDO DA HIDRÓLISE COMO SUBSTRATO SÓLIDO POR FERMENTAÇÕES EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA COM PRESENÇA DE SUBSTRATO SÓLIDO.....	46

5.7	CORRELAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL E O CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES NOS DIFERENTES PROCESSOS FERMENTATIVOS	48
6	CONCLUSÃO	49
7	REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica (BLC) é uma fonte abundante e disponível de energia renovável. A BLC obtida a partir de resíduos agroindustriais apresenta um enorme potencial de produção de etanol, do então denominado “etanol de segunda geração”. As tecnologias de produção de etanol, a partir destes materiais, são promissoras alternativas para obtenção de energia sustentável, eficiente, segura e de potencial baixo custo. Adicionalmente, considerações como a preservação ambiental, limitações para expansão de área plantada e a consequente competição com a produção de alimentos, motivam ainda mais o aproveitamento dos resíduos agroindustriais para produção de biocombustíveis (BRAZ, 2014).

Constituída principalmente por polímeros de carboidratos, dos quais a celulose é o mais abundante, a BLC compreende cerca de dois terços de toda matéria orgânica existente no planeta. Estima-se que 123 bilhões de toneladas métricas de CO₂ são fixadas por ano através da fotossíntese (BRAZ, 2014).

O Brasil por ser um país fortemente agrícola, gera anualmente, um volume considerável de biomassa vegetal. A produção anual referente à safra de 2015 para cana-de-açúcar foi superior a 750 milhões de toneladas. Aproximadamente 28 % do total de massa da cana-de-açúcar é constituída pelo bagaço (sem considerar a palha que fica nas plantações). Assim, o Brasil produziu mais de 210 milhões de toneladas só de bagaço de cana na safra 2015 (CONAB, 2016).

Além da cana-de-açúcar, o Brasil destaca-se ainda pela alta produção de arroz, atingindo na safra 2015/2016, 10,544 milhões de toneladas (CONAB, 2016). Considerando que a casca do arroz representa de 18 a 22 % do peso do grão *in natura*, e que esta é formada por material lignocelulósico, tem-se neste subproduto um material com elevado potencial de utilização como BLC na produção de etanol de segunda geração.

As matérias-primas de origem lignocelulósica contêm de 20 % a 60 % de celulose, que pode ser totalmente convertida à glicose após etapa de pré-tratamento ou hidrólise química (ácido ou básica) para desorganização do complexo lignocelulósico. Por sua vez, a glicose caracteriza-se por ser um monossacarídeo utilizado pela maioria dos microrganismos, fazendo desta molécula um importante bloco de construção para a obtenção de uma gama de substâncias de interesse

comercial, abrangendo desde combustíveis até polímeros (KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004).

A bactéria *Zymomonas mobilis* é um microrganismo que se destaca na produção de etanol, devido a uma série de características vantajosas, tais como: alta taxa de crescimento, com menor formação de biomassa que as leveduras; boa resposta à manipulação física e química do ambiente; limitada formação de produtos; boas respostas em diferentes condições de cultivo, e habilidade promissora de transformar açúcares em etanol e gás carbônico em condições semelhantes àquelas exigidas pelas leveduras (SANTOS, 2012).

Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de etanol de segunda geração pela bactéria *Zymomonas mobilis* CP4, em meio de cultivo contendo hidrolisados ácidos de bagaço de cana-de-açúcar e de casca de arroz, utilizando diferentes processos fermentativos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Produzir etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* CP4, a partir de hidrolisados ácidos de bagaço de cana-de-açúcar e de casca de arroz utilizando diferentes processos fermentativos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar diferentes condições de hidrólise ácida para liberação de açúcares do bagaço de cana-de-açúcar e da casca de arroz;
- Avaliar diferentes condições de processos fermentativos: fermentação submersa, fermentação em estado sólido e fermentação submersa com presença de suporte sólido para produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CP4;
- Avaliar o efeito da adição de hidrolisado ácido no meio de cultivo;
- Avaliar a utilização de diferentes suportes sólidos (algodão e resíduo remanescente da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e da casca de arroz) na Fermentação em estado sólido (FES) e Fermentação submersa com suporte sólido (FSbSS);
- Determinar a produção de etanol, biomassa e o consumo de açúcares nos diferentes processos avaliados.
- Selecionar o melhor processo fermentativo para produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CP4.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO E RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

O etanol é considerado o combustível renovável com maior potencial para substituir combustíveis derivados de fósseis. Atingiu uma produção mundial de 50 milhões de m³ em 2007 e mais de 100 milhões de m³ em 2012, levando ainda a redução significativa das emissões de gases do efeito estufa (KANG et al., 2014).

Considerado menos poluente ao meio ambiente quando comparado à gasolina e ao diesel a produção de etanol tem um apelo maior em relação às questões ambientais, uma vez que também pode ser produzido a partir de resíduos industriais, agrícolas e florestais, neste caso, gerando o etanol de segunda geração. Assim, os biocombustíveis de segunda geração são obtidos partindo de resíduos do processamento primário (SOCCOL et al., 2011).

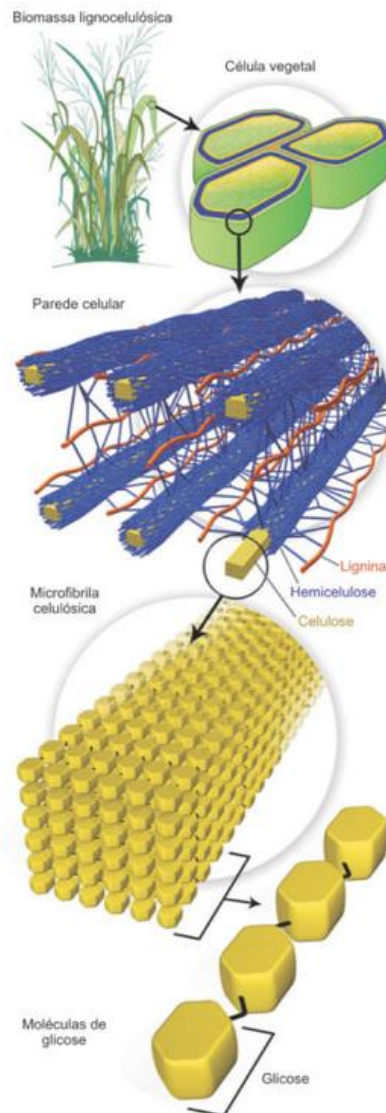
O uso de biomassa como matéria-prima residual para a produção de biocombustível tem despontado como solução para se aumentar o rendimento da produção de etanol em relação à matéria-prima, sem que haja a necessidade de se expandir a área de plantio, favorecendo toda a cadeia produtiva e preservando o meio ambiente (TODHANAKASEM et al., 2014; HOMBACH et al., 2016).

O bioetanol de segunda geração pode ser produzido em locais que já fabricam etanol de primeira geração, uma vez que operações como fermentação e destilação podem ser compartilhadas na mesma planta. Este é o caso da produção de bioetanol a partir da cana de açúcar, que é de primeira geração, podendo ser obtido bioetanol de segunda geração utilizando-se o bagaço remanescente do processo anterior, tornando o processo com custo reduzido. Assim, para que seja vantajosa a utilização destes materiais na elaboração de bioetanol, estes devem proporcionar alta produtividade, alta concentração de bioetanol durante o processo de destilação e redução na demanda de energia (SOCCOL et al, 2011).

Além do bagaço de cana-de-açúcar, outros resíduos lignocelulósicos, provenientes de resíduos agrícolas, florestais e de indústrias alimentícias podem ser utilizados. Constituem-se em matéria-prima para a produção de etanol, devido ao seu caráter renovável, abundante e de baixo custo (SANTOS, 2012). Pode-se citar como resíduos lignocelulósicos o bagaço de cana, palha de milho, casca de soja, farelo de trigo, casca de arroz, entre outros (PEREIRA, 2008).

Estes materiais são compostos principalmente por três componentes, a celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1). Juntos, os polissacarídeos, celulose e hemicelulose servem como substratos iniciais para sacarificação e fermentação subsequente (LIMAYEM; RICKE, 2012).

Figura 1 - Materiais lignocelulósicos: estrutura e principais componentes.



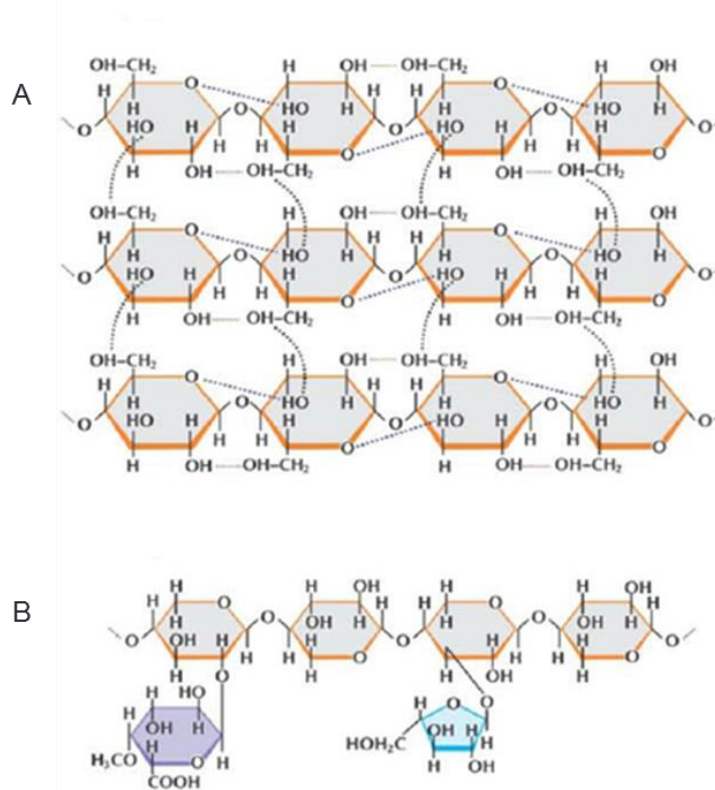
FONTE: SANTOS et al., 2012.

A celulose é um polissacarídeo linear estrutural da parede celular da planta que consiste de uma cadeia longa de monômeros de glicose, ligados por ligações β (1 \rightarrow 4), podendo atingir milhares de unidades de glicose em comprimento. As numerosas ligações de hidrogênio entre as moléculas levam a uma estrutura de matriz cristalina e forte. Estas ligações transversais intercadeias realizadas entre os numerosos grupos

hidroxilas atribui às microfibrilas maior rigidez e compacidade (Figura 2A) (LIMAYEM; RICKE; 2012).

A hemicelulose é uma estrutura amorfa e variável formada de heteropolímeros incluindo hexoses (D-glucose, D-galactose e D-manose), bem como pentoses (D-xilose e L-arabinose) e pode conter ácidos de açúcares (ácidos urônicos), a saber, D-glucurônico, D-galacturônico e ácidos metilgalacturônicos. A cadeia principal é composta principalmente de xilano com ligações $\beta(1\rightarrow4)$ que incluem D-xilose (quase 90%) e L-arabinose (aproximadamente 10%). A frequência das ramificações varia de acordo com a natureza e a fonte de matérias-primas (Figura 2B) (LIMAYEM; RICKE; 2012).

Figura 2 - Estrutura Química da (A) Celulose e (B) Hemicelulose.

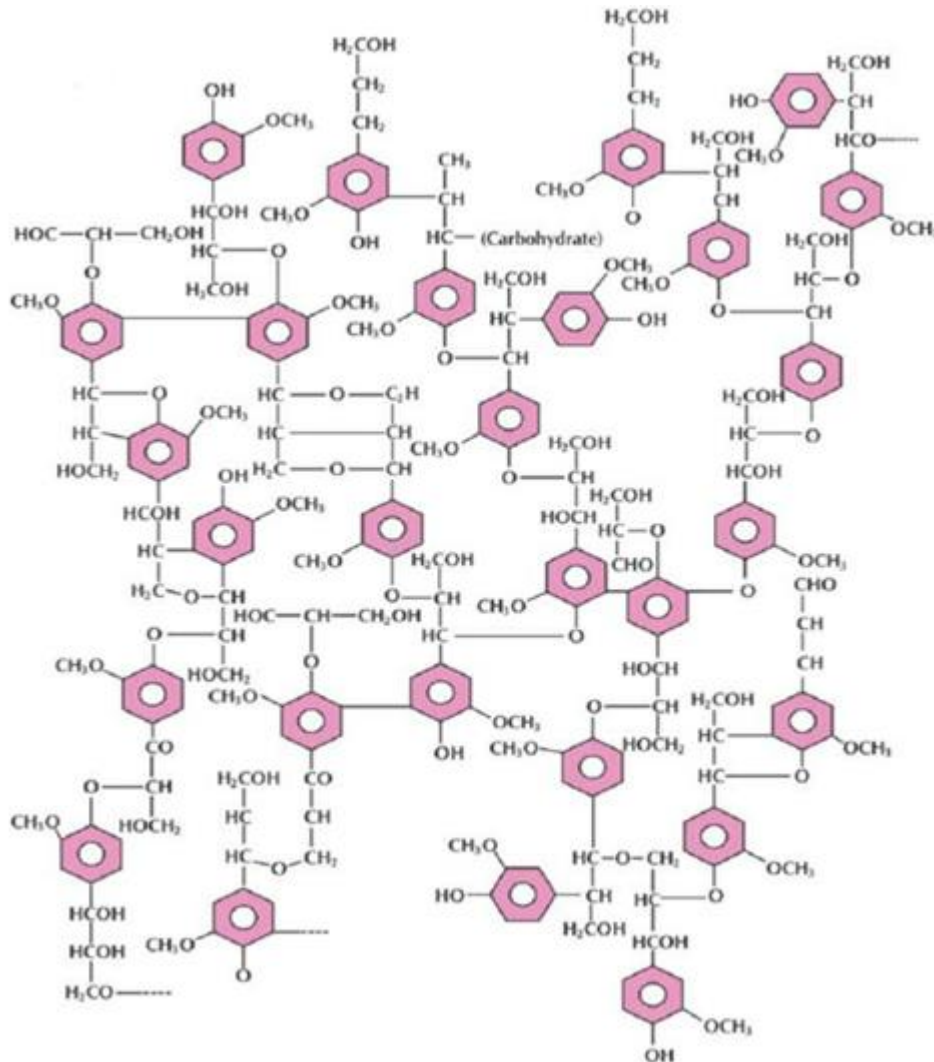


FONTE: Adaptado de AKHTAR et al., 2015.

A lignina é um biopolímero aromático e rígido, com peso molecular de 10000 Da, composto por três monômeros fenólicos de álcool fenil propiônico, cumaril-, coniferílico e álcool sinapílico; ligado por meio de ligações covalentes a xilanos (porção hemicelulose), conferindo rigidez e alto grau de compacidade da parede da célula da

planta, funcionando portanto, como uma barreira contra a degradação enzimática e/ou microbiana (Figura 3) (FURLAN, 2009).

Figura 3 - Estrutura Química da Lignina.



FONTE: Adaptado de AKHTAR et al., 2015.

Devido à grande disponibilidade de resíduos agrícolas foi estimado que 491 bilhões de litros de etanol de segunda geração possam ser gerados a partir de biomassa lignocelulósica residual, ampliando em até 16 vezes a sua produção anual (SARKAR et al., 2012). Só nos Estados Unidos, a biomassa residual gerada é estimada em torno de 1,4 bilhões de toneladas de matéria seca por ano, 30 % originadas de florestas. Neste contexto, tais biomassas podem suprir em grande escala a produção deste combustível, utilizando diferentes resíduos agroindustriais (CARDONA et al., 2007).

Atualmente, os resíduos derivados de materiais lignocelulósicos mais promissores para serem empregados em bioprocessos são o bagaço de cana, palha de arroz, de milho e de trigo, provenientes da América do Sul, Ásia, Estados Unidos e Europa, respectivamente (CHENG et al., 2008).

Sendo o Brasil um país fortemente agrícola grande volume de biomassa vegetal é gerado anualmente. Por exemplo, a safra de 2015 de cana-de-açúcar, atingiu valores superiores a 750 milhões de toneladas. Aproximadamente 28 % do total de massa da cana-de-açúcar é constituída pelo bagaço (sem considerar a palha que fica nas plantações). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016) a safra brasileira de 2016, produziu mais de 210 milhões de tonelada de bagaço de cana-de-açúcar (Figura 4).

Figura 4 - Bagaço de cana-de-açúcar



Fonte: <http://www.usinasadomingos.com.br/site/?pagina=bagaco>

Constituído por celulose, hemicelulose e lignina (Tabela 1), compõe em média, 28 % do peso da cana-de-açúcar. A hemicelulose e a celulose apresentam-se como uma das principais frações estruturais, representando uma fonte potencial de xilose e glicose, respectivamente; porém, a obtenção desses açúcares requer a aplicação de técnicas que permitam a sua extração seletiva (BETANCUR & PEREIRA JR, 2010).

Tabela 1 - Composição química do bagaço de cana em base úmida.

Composição química	(%)
Glicose	19,50
Xilose	10,50
Arabinose	1,50
Galactose	0,55
Lignina	9,91
Organosolúveis	2,70
Outros Açúcares redutores	1,85
Cinzas	1,6
Umidade	50,00
Hexoses Totais	20,04
Pentoses Totais	12,00

FONTE: (SANTOS, 2012).

O Brasil destaca-se ainda pela alta produção de arroz, atingindo na safra 2015/2016, 10,544 milhões de toneladas (CONAB, 2016), gerando também grande quantidade de casca que pode ser utilizada na produção de etanol de segunda geração.

A casca (Figura 5), camada mais externa do arroz, é um material lignocelulósico produto da etapa de descamamento do grão e representa de 18 a 22 % do peso deste, *in natura*. É formada, principalmente, por três compostos orgânicos: celulose, lignina e hemicelulose (Tabela 2) (ROCHA, 1998; FURLAN, 2009).

Figura 5 - Casca de Arroz.



FONTE: MFRural. <http://www.mfrural.com.br/detalhe/casca-de-arroz-144195.aspx>

Tabela 2 - Composição Química da Casca de Arroz

Componentes	Concentração (%)
Glicose	34,1
Xilose	12,7
Arabinose	1,3
Celobiose	0,4
Lignina insolúvel	22,9
Lignina solúvel	6,1
Ácido acético	1,3
Proteína	2,0
Furfural	0,9
Extrativos	3,1
HMF	0,3
Insolúveis	9,7
Cinzas	16,9

FONTE: HICKERT, 2011

3.2. PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

O pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos para a produção de bioetanol é uma etapa necessária para a liberação dos açúcares monoméricos (hexoses e/ou pentoses), a partir da hidrólise de polissacarídeos (celulose e / ou hemicelulose), os quais podem ser em seguida fermentados por microrganismos (SANTOS 2012; DIONISI, 2014; TODHANAKASEM et al., 2014). É, portanto, um passo essencial para maximizar a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, pois pode reduzir a biomassa lignocelulósica recalcitrante, que evita a hidrólise completa de celulose (Figura 6) e reduz o rendimento de etanol (CHIARAMONTI et al., 2012; ZHOU et al., 2014).

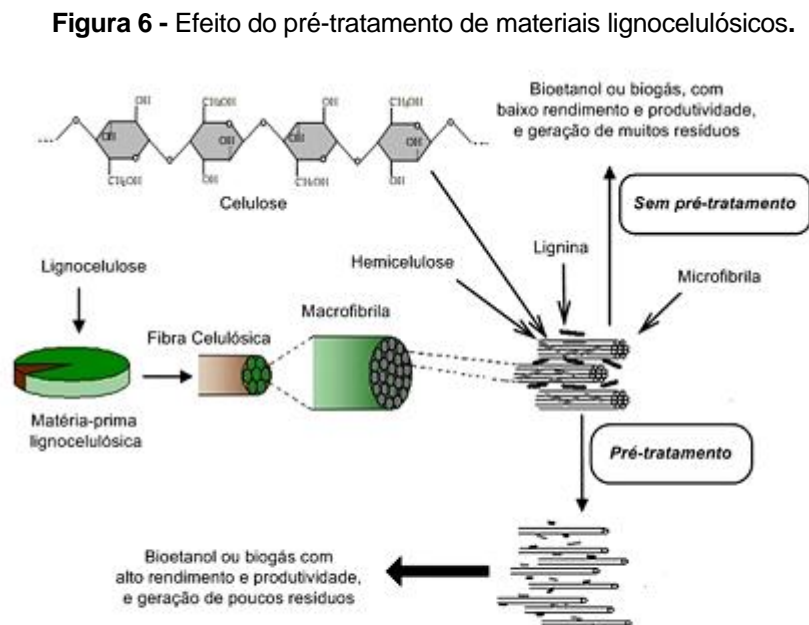
Os processos de pré-tratamento podem ser classificados como físicos, físico-químico, biológico ou uma combinação destes; de modo que a aplicação de qualquer uma das técnicas culmina na redução do tamanho da partícula, destruição da estrutura da lignina, remoção da hemicelulose, diminuição da cristalinidade de celulose, e

aumento do tamanho dos poros e / ou volume de biomassa (HSU, 1996; CHIARAMONTI et al., 2012).

Dentre os tratamentos químicos, a hidrólise alcalina é um dos mais empregados como um pré-tratamento para posterior hidrólise enzimática. A aplicação de bases pode romper a lignina e parte da hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose, facilitando assim, a ação de enzimas sobre a celulose. As bases mais utilizadas para este tipo de tratamento são hidróxido de cálcio e hidróxido de sódio (SUN & CHENG, 2002).

A hidrólise enzimática normalmente é feita com uma mistura de enzimas para que seja mais rápida e tenha maior liberação de açúcares. As enzimas mais empregadas são celulases, β -glucosidades e endo-hidrolases (endo-1,4- β -glucanase, endo-1,4- β -xilanase e endo-1,4- β -mananase), entre outras (WILLÖR et al, 2009).

A Figura 6 ilustra um modelo geral de pré-tratamento em material lignocelulósico.



FONTE: TAHERZADEH & KARIMI, 2008.

Estima-se que 30 % do custo de processamento da biomassa para etanol de segunda geração é derivado do pré-tratamento necessário para a quebra do material lignocelulósico, de modo que pode ser considerada como o passo mais caro do

processo. Sendo assim, diversas soluções têm sido propostas objetivando redução de custos (HSU, 1996).

Tratamento com ácido é uma técnica efetiva na solubilização do componente hemicelulósico da biomassa, provocando desacetilação e despolimerização da fração hemicelulósica. Combinações entre concentração de ácido, temperatura e tempo de reação podem gerar grandes quantidades de açúcares provenientes da fração hemicelulósica (BAUDEL, 2006).

A utilização de H_2SO_4 permite uma elevada reatividade da fibra celulósica, porém, ao empregar elevadas concentrações deste composto, o processo demanda complexas configurações de equipamentos, necessitando de elevado consumo de água e energia. Após esta etapa é necessária a neutralização do pH. Para diminuição de custos podem ser utilizados ácidos diluídos que funcionam como catalisadores pela liberação de prótons que atuam nas ligações glicosídicas entre os monômeros de açúcar nas cadeias poliméricas, despolimerizando assim, as frações de lignina e hemicelulose e interrompendo a estrutura cristalina da celulose. Este método libera ao final, principalmente, açúcares como glicose, xilose e arabinose; os quais podem ser convertidos em compostos de interesse durante processos fermentativos (HSU, 1996). Entre os ácidos utilizados para este tipo de pré-tratamento, encontram-se: H_2SO_4 , HCl, CH_3COOH e HNO_3 (BAUDEL, 2006).

Dentre os diferentes métodos de tratamento ácido, o ácido sulfúrico é amplamente aplicado devido à sua elevada atividade catabólica. O pré-tratamento com ácido sulfúrico pode solubilizar grande quantidade de celulose e lignina, e a maioria das hemiceluloses (TAHERZADEH & KARIMI, 2008). A hidrólise pode ser realizada com ácido concentrado ou diluído, sendo que hidrólise ácida diluída é a opção mais adequada e provavelmente o método mais comum entre os pré-tratamentos químicos, devido ao seu baixo custo e menor risco potencial em relação à utilização de ácidos concentrados. Pode ser efetuada em tempo de reação curto (1-5 min) e de alta temperatura, ou a longo tempo (30-90 min) e a temperaturas mais baixas (CHIARAMONTI et al., 2012).

O pré-tratamento intenso de hidrólise ácida, no entanto, gera uma variedade de compostos inibidores tais como o ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, derivados de furano e compostos fenólicos misturados com o hidrolisado, os quais afetam negativamente a eficiência do processo fermentativo (CHIARAMONTI et al.,

2012; TODHANAKASEM et al, 2014). Estes compostos inibidores acometem tanto o crescimento de bactérias e leveduras quanto a ação das enzimas envolvidas nas rotas metabólicas, resultando em uma diminuição da taxa de produção de etanol e rendimento total de etanol (SAKAI et al., 2007).

Deste modo faz-se necessária a seleção apropriada dos pré-tratamentos a pH baixo, objetivando a redução ou a não formação de compostos inibidores (CHIARAMONTI et al., 2012).

3.3. *Zymomonas mobilis* COMO PRODUTORA DE ETANOL POR FERMENTAÇÃO

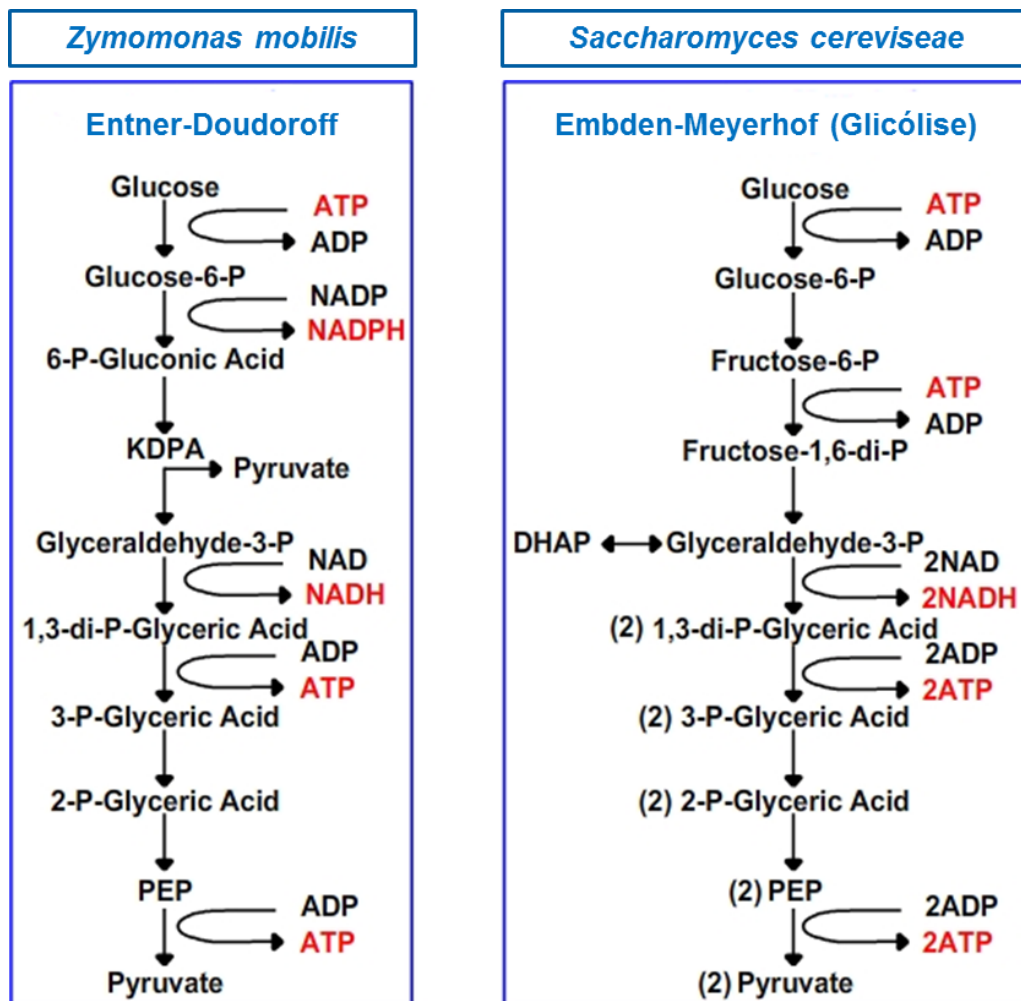
As leveduras, particularmente do gênero *Saccharomyces*, são normalmente a primeira escolha para produção industrial de etanol. Isto se deve às suas características de boa capacidade fermentativa, alta tolerância ao etanol e inibidores (formados tanto durante o pré-tratamento de matérias-primas quanto durante a fermentação) e à capacidade de crescer rapidamente sob as condições anaeróbicas durante a fermentação em larga-escala (KNAUF, 2004).

Além da levedura, outros microrganismos como, por exemplo, a bactéria *Zymomonas mobilis* e *Escherichia coli*, têm sido estudadas. *Zymomonas mobilis* é uma bactéria Gram-negativa não patogênica com potencial para produzir etanol através da via de Entner-Doudoroff (SWINGS & DE LEY, 1977; SANTOS, 2012; TODHANAKASEM et al., 2014). *Z. mobilis* produz cerca de 1,9 mol de etanol por mol de glicose, com velocidade três a quatro vezes maior que *Saccharomyces cerevisiae* (SANTOS, 2012). *Zymomonas mobilis* quando comparada a *Saccharomyces cerevisiae* tem menor produção de biomassa, não requer adição controlada de oxigênio durante a sua produção, possui alta receptividade à manipulação genética e alta tolerância ao etanol (16% v/v) (ROGERS et al,1982). Uma importante característica que permite essa adaptação a altos níveis de etanol seria a alteração da composição da membrana lipídica, aumentando as propriedades da barreira hidrofóbica assim, evitando a entrada de etanol no interior da célula, e diminuindo a perda de material intracelular (SCHMIDT et al, 1986). Esta característica deve-se a sua membrana plasmática que contém hopanóides (lipídeos pentacíclicos triterpenóides, responsáveis pela estabilização da membrana), regulando a fluidez e a permeabilidade (SWINGS & DE LEY, 1977). Em níveis acima do máximo tolerável,

o etanol atua na dissolução da membrana citoplasmática, afetando a sua fluidez e aumentando a sua permeabilidade, resultando no fluxo de íons, cofatores e coenzimas para o meio exterior (SCHMIDT et al, 1986).

Assim, *Zymomonas mobilis* é extremamente atraente para a produção de etanol de segunda geração, a partir de glicose proveniente da fração celulósica, em virtude de sua elevada capacidade de absorção de glicose, altas taxas específicas de produção de etanol, resultando em elevados valores de produtividade. Apesar da sua capacidade de fermentar açúcares tais como sacarose e frutose, taxas máximas de absorção específica do açúcar e produção de etanol pelo microrganismo são atingidas quando a glicose é utilizada como substrato (LIN & TANAKA, 2006). A Figura 7 traz uma comparação das vias biossintéticas de produção de etanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* e pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 7 - Vias Biossintéticas de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.



FONTE: Adaptado de Classes Midlandstech.

Conforme demonstrado na Figura 7, na via de Entner Doudoroff, a partir de cada molécula de glicose há a produção de uma molécula de ATP e duas moléculas de etanol. Inicialmente a glicose é transportada do meio para o interior da célula, sendo fosforilada a glicose-6-fosfato através da enzima glucoquinase. Em seguida, é formada a molécula de glucono-6-fosfato - δ lactona, através da desidrogenação pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (que age na presença da coenzima NADP).

A molécula de glucono-6-fosfato δ lactona sofre reação de hidratação, através da enzima 6-fosfato gluconolactonase, e, com isso, ocorre a formação da molécula 6-fosfogluconato, que é desidratada pela enzima 6-fosfogluconato desidratase e forma a molécula 2-ceto-3-desoxi-fosfogluconato. Esta é hidrolisada, através da enzima aldolase, ocorrendo a formação de outras duas moléculas: gliceraldeído-3-fosfato e piruvato.

A molécula de gliceraldeído-3-fosfato pode ser utilizada na síntese de componentes celulares ou sofrer as mesmas transformações da rota de *Embder-Meierhpof-Parnas* (EMP) na sua conversão para piruvato. Este importante intermediário sofre descarboxilação, reação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase (requer Mg^{++} e tiamina pirofosfato como co-fatores), gerando acetaldeído e dióxido de carbono através de reação irreversível. Finalmente o acetaldeído é reduzido a etanol. A enzima álcool desidrogenase é comum a muitos microrganismos; porém, a enzima piruvato descarboxilase é a enzima-chave desta via, pois direciona o fluxo de piruvato para etanol, além de ser pouco encontrada em bactérias.

O microrganismo *Zymomonas mobilis* também se diferencia da levedura pelo maior crescimento em anaerobiose e, portanto, não necessita de controle de oxigênio para manter sua viabilidade em cultivo contínuo. Além disso, a bactéria tolera elevadas concentrações de glicose, fermentando etanol em níveis maiores (especialmente em cultivo contínuo), produzindo elevadas concentrações deste produto (GUNASEKARAN; RAJ,1999).

A utilização de material lignocelulósico pré-tratado em processos fermentativos podem impedir substancialmente a eficiência da produção de etanol de muitos microrganismos, devido à geração de substâncias tóxicas durante o pré-tratamento (TODHANAKASEM et al., 2014). Alguns compostos gerados implicam na redução drástica na produção de etanol, tais como ácido acético, furfural, ácido orgânico

enquanto outros, como 5-hidroximetilfurfural, apresentam efeito mais moderado (RANATUNGA et al., 1997).

No entanto, *Zymomonas mobilis* pode ter sua tolerância à substâncias tóxicas melhorada devido a sua capacidade de crescimento na forma de biofilme (LI et al., 2006). Assim, a utilização de um substrato sólido durante o processo fermentativo para a produção de bioetanol por *Zymomonas mobilis*, mostra-se como uma alternativa para evitar ou reduzir a queda na produção deste metabólito decorrente da formação de compostos tóxicos.

3.4. PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os processos fermentativos podem ser do tipo fermentações submersas (FS) fermentação em meio semissólido ou estado sólido (FES).

A fermentação submersa (FS) é caracterizada pela utilização de um meio fermentativo líquido, com nutrientes solúveis. Este processo tem como vantagens a facilidade de controle de parâmetros como aeração, agitação, pH, temperatura e a possibilidade de automação (COUTO; SANROMAN, 2006). A maior probabilidade de contaminação, pela maior quantidade de água, é um inconveniente do processo.

A fermentação em estado sólido (FES) envolve o cultivo de microrganismos nas superfícies de partículas orgânicas úmidas, dentro de um leito em que há uma fase gasosa contínua nos poros entre as partículas sólidas (há um mínimo de água líquida nestes poros, sendo restrita a filmes finos nas superfícies das partículas e umas poucas gotículas). A água necessária para o crescimento do microrganismo encontra-se absorvida dentro das partículas do substrato (MAZAHARI et al., 2012). O ambiente fornecido ao microrganismo neste sistema é bem diferente daquele fornecido pela fermentação submersa. A disponibilidade restrita de água pode estimular a produção de alguns metabólitos específicos, que não seriam produzidos na fermentação submersa, além de possibilitar, em alguns casos, uma maior produtividade volumétrica e um maior rendimento em relação à fermentação submersa. Outra vantagem associada à FES é a possibilidade de obtenção de extratos mais concentrados, facilitando o processo de purificação do metabólito de interesse (MITCHELL et al., 2006).

Uma variável da FES é a fermentação em estado misto ou fermentação submersa com presença de suporte sólido (FSbSS). Segundo (KUMAR, 1998) este tipo de processo fermentativo é caracterizado como adição de meio líquido ao sólido (substrato).

As FES e FSbSS, por terem suportes sólidos, apresentam crescimento microbiano e a formação de produtos ocorrendo na superfície de substratos sólidos com possível formação de biofilme.

A maioria dos biofilmes exibe certa heterogeneidade, existindo conjuntos de agregados celulares, que exibem densidades variáveis, originando aberturas e canais que permitem a passagem da água. Os canais aquosos dos biofilmes permitem a troca de nutrientes e metabólitos, assim como a remoção de metabólitos potencialmente tóxicos. Biofilmes são matrizes biológicas ativas compostas por células e material extracelular depositado sobre uma superfície sólida. Muitas vezes, além dos microrganismos que produzem esse material viscoso, estão também aderidos outros microrganismos e partículas diversas (TRISTEZZA et al., 2010).

Assim, o uso da técnica de fermentação em estado sólido oferece distintas vantagens sobre a fermentação submersa, dentre as quais: a simplicidade do meio, principalmente para países com abundância de biomassa e de resíduos agroindustriais, e o uso de reatores menores, proporcionando economia de espaço. Destaca-se, ainda, a possibilidade dos rendimentos serem maiores que os obtidos em fermentação submersa, e maior resistência aos resíduos tóxicos provenientes do tratamento (vantagem também encontrada na fermentação mista) e especialmente, a facilidade de controle de contaminação proporcionada pela pouca quantidade de água no sistema viabilizando a obtenção de produtos com custo mais reduzido (MACHADO et al., 2006).

A formação do biofilme ocorre pela adesão de microrganismos às superfícies sólidas onde existam nutrientes disponíveis para sua multiplicação. Esses microrganismos são inicialmente depositados na superfície sólida, estabelecendo uma interação fraca com o substrato, chamada de adesão reversível. Posteriormente, podem aderir mais fortemente (adesão irreversível) com auxílio de flagelos, fímbrias, pili e o material de natureza polissacarídica extracelular secretado para então crescer e multiplicar, formando uma colônia de células. Para isso, a formação de polímeros orgânicos é essencial, o que contribui para a apropriada colonização do local (TRISTEZZA et al., 2010). Podemos afirmar então que biofilmes

são agremiações funcionais de microrganismos aderidos a uma superfície e embebidos em substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (KUMAR, 1998).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CASCA DE ARROZ

A casca de arroz (*Oryza sativum.*), utilizada no presente trabalho, foi gentilmente cedida por empresa cerealista da região de Londrina-PR, e mantida sob refrigeração de 4-8 °C. A casca de arroz foi triturada em moinho de facas com obtenção de partículas de dimensão igual ou inferior a 1,7mm.

4.2. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), utilizado no presente trabalho, foi obtido em uma usina localizada na região noroeste do estado do Paraná, e mantido sob refrigeração entre 4-8 °C. O bagaço foi triturado em moinho de facas com obtenção de partículas de dimensão igual ou inferior a 1,7mm.

4.3. MICRORGANISMO

Foi utilizada à cepa *Zymomonas mobilis* CP4, cedida pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.4. MEIO DE PRESERVAÇÃO DA *Z. mobilis*

Após incubação a temperatura de 30°C, 100rpm por 24 horas, no meio descrito abaixo (Tabela 3), o microrganismo foi mantido em eppendorf (1,5mL), adicionado de glicerol (20% v/v) e estocada a -80°C (CAMILIOS NETO et al., 2005).

O microrganismo foi também mantido em placas de petri com meio de crescimento sólido (descrito na Tabela 3, adicionado de 2,0% de Ágar (m/v)), e armazenado em temperatura ambiente.

Tabela 3 - Meio de crescimento e preservação de *Zymomonas mobilis*.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	20
Extrato de Levedura	2,5
(NH ₄)SO ₄	1
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5

FONTE: Adaptado de CAMILIOS NETO et al., 2005.

4.5. PRÉ-INÓCULO E INÓCULO: COMPOSIÇÃO DO MEIO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os meios para obtenção do inóculo foram preparados em Erlenmeyers de 125 mL contendo 30mL do meio referenciado na Tabela 3. Estes foram inoculados (duas alçadas) com *Zymomonas mobilis* CP4 previamente crescidas em placas por 24 horas a 30 °C. Os frascos foram incubados por 12 h a 30 °C e 100rpm. Estes foram utilizados para o inóculo na proporção de 4% (Inóculo/Volume meio de fermentação).

4.6. HIDRÓLISE ÁCIDA

A hidrólise ácida da casca de arroz e do bagaço de cana foi realizada para obtenção do material hidrolisado e utilização como substituinte parcial do meio de fermentação.

Para casca de arroz a hidrólise foi avaliada com diferentes concentrações de H₂SO₄ [em massa de ácido por massa de casca de arroz (% m/m)]: 1 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 % e 10 %, e uma relação sólido-líquido de 1:4 (g/mL); durante 30 e 60 minutos. Foi realizado um controle para cada tempo de hidrólise, substituindo-se o ácido por água. Após a hidrólise, o material lignocelulósico foi manualmente prensado para separação da fração sólida do hidrolisado (fase líquida). A eficiência do processo de hidrólise foi acompanhada pela liberação de açúcares determinados por grau Brix e por quantificação de açúcares redutores totais (DUBOIS et al., 1956).

Os sólidos remanescentes da primeira hidrólise foram submetidos a um segundo processo de hidrólise: a 8 % de H₂SO₄ (m/m) relação sólido-líquido de 1:4 (g/mL); durante 30 minutos. Novamente o material lignocelulósico remanescente foi manualmente prensado para separação da fração sólida do hidrolisado (fase líquida), onde foram avaliados os sólidos solúveis totais (grau Brix (° Bx)) e açúcares redutores totais (DUBOIS et al., 1956).

Após avaliação dos resultados de ambos os processos, optou-se por utilizar apenas um passo de hidrólise. Assim, os experimentos de fermentação descritos nas próximas seções utilizaram apenas a condição de concentração de H₂SO₄, 8,0 % (m/m), temperatura de hidrólise 121 °C e tempo de exposição de 30 minutos em autoclave. O meio hidrolisado foi neutralizado com hidróxido de amônio 1M até pH 7 (neutro) e armazenado em câmara fria a 4 °C.

A fração sólida do hidrolisado foi lavada com água destilada até que atingisse o pH 7 (neutro). Posteriormente foi seca em estufa a 60 °C por três dias, para ser utilizada como suporte nos processos fermentativos do tipo sólido e misto.

4.6.1. HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

As condições para a realização da hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar foram selecionadas a partir da literatura (KUMAR et al., 2015) e anteriormente testadas também para a casca de arroz, apresentando as seguintes variáveis: concentração de H₂SO₄, 8,0 % (m/m); relação sólido-líquido 1:6 (g/mL); temperatura de hidrólise 121 °C e tempo de exposição de 30 minutos em autoclave. Após a hidrólise, o material lignocelulósico foi manualmente prensado para separação da fração sólida do hidrolisado (fase líquida). O meio hidrolisado foi avaliado quanto ao teor de açúcares redutores totais (DUBOIS et al., 1956) e Brix, em seguida neutralizado com hidróxido de amônio 1M até pH 7 (neutro) e armazenado em câmara fria a 4 °C .

A fração sólida do hidrolisado foi lavada com água destilada até que atingisse o pH 7 (neutro). Posteriormente foi seca em estufa a 60 °C por três dias, para ser utilizada como suporte nos processos fermentativos do tipo sólido e misto.

4.7. FERMENTAÇÕES

Foram avaliadas diferentes condições de processo fermentativo: fermentação submersa (FSb), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa com presença de suporte sólido (FSbSS).

Nas FES e FSbSS utilizou-se como substrato sólido, algodão e os remanescentes da hidrólise ácida da casca de arroz e do bagaço de cana.

Os meios de fermentação foram compostos pelo meio básico (MB) (Tabela 4) adicionado do hidrolisado (fração líquida proveniente das hidrólises) e/ou meio sintético (solução de glicose), mantendo a concentração final do meio de cultivo em 100 g/L de glicose. As concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ variaram de acordo com a presença ou não de hidrolisado no meio de cultivo. Todos os ensaios fermentativos foram realizados em triplicata.

Tabela 4 – Meio Básico (MB).

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de Levedura	2,5
KH_2PO_4	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5

FONTE: Adaptado de CAMILIOS NETO et al, 2005.

4.7.1. Avaliação do efeito do hidrolisado e do excesso de sulfato de amônio na produção de etanol- Fermentações submersas

Anteriormente aos ensaios que comparavam as diferentes estratégias fermentativas, foi avaliada a influência de dois fatores na produção de etanol e crescimento de *Zyomonas mobilis*: a utilização de um hidrolisado ácido como fonte de carbono, e o efeito do excesso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no meio de cultivo (proveniente da reação de neutralização deste hidrolisado). Foram realizadas três fermentações submersas, com diferentes composições de meio. A composição do meio de cultivo das três fermentações possuía meio básico (MB) e glicose; com variação no teor de sulfato de amônio e presença ou não do hidrolisado (Tabela 5). As duas concentrações de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizadas nos experimentos foram definidas a partir da concentração deste composto no meio de cultivo após a adição

do hidrolisado de casca de arroz neutralizado (25,5 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e a partir da concentração deste composto no meio de cultivo sem a adição do hidrolisado de casca de arroz neutralizado (7,6 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - concentração presente no MB).

Tabela 5 – Composição do meio de cultivo quanto ao teor de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e presença de hidrolisado em diferentes ensaios.

Ensaio	Componentes
1- Controle A - Sem hidrolisado	Meio básico, glicose e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25,5 mM
2- Controle B – Sem hidrolisado	Meio básico, glicose e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7,6 mM
3- Hidrolisado de Casca de Arroz	Meio Básico, glicose +Hidrolisado de Casca de Arroz e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25,5 Mm
4- Hidrolisado de Bagaço de cana-de-açúcar	Meio Básico, glicose +Hidrolisado de Bagaço de Cana-de-açúcar e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25,5 Mm

FONTE: O autor.

4.7.2. Avaliação de diferentes processos fermentativos: Fermentação submersa, fermentação em estado sólido e fermentação submersa na presença de um suporte sólido – algodão

Inicialmente realizou-se a comparação da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* obtida através de diferentes processos fermentativos: fermentação submersa (FSb), fermentação em estado sólido utilizando algodão como suporte (FES-Algodão) e fermentação submersa com presença de algodão como suporte sólido (FSbSS-Algodão). Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 30 mL de meio. Para FES adicionou-se 1,5 g do algodão e para FSbSS 0,75 g de algodão. Os meios foram esterilizados por 20 minutos, a 121 °C, resfriados e inoculados em uma proporção de 4 % de volume de inóculo em volume de solução umedecedora.

Utilizou-se uma substituição parcial do meio de cultivo por hidrolisado ácido de casca de arroz e hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar, nos três processos fermentativos. A solução umedecedora (hidrolisado de casca de arroz ou hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, solução de glicose e solução de MB) foi adicionada ao substrato sólido em volume suficiente para se atingir a máxima capacidade absorviva (30 mL para o algodão). Para FSbSS adicionou-se o volume

suficiente para se atingir o dobro da máxima capacidade absorviva (30 mL para 0,75 g de algodão). Os meios inoculados foram incubados em shaker a 30 °C, 100rpm por 24 horas.

4.7.3. Avaliação de diferentes processos fermentativos com diferentes suportes sólidos

Por fim, realizou-se uma comparação dos níveis de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CP4 obtidos por meio dos três diferentes processos fermentativos; adicionalmente avaliando a substituição do algodão (utilizado como suporte sólido tanto para o processo de fermentação em estado sólido (FES) como para o processo de fermentação submersa com presença de um substrato sólido (FSbSS)), pelo sólido remanescente (resíduo) da hidrólise ácida, oriundo do bagaço de cana-de-açúcar e da casca de arroz.

As fermentações submersas continham 30 mL de meio de cultivo composto por meio MB, solução de glicose e hidrolisado ácido de casca de arroz ou de bagaço de cana-de-açúcar.

Os cultivos para FES continham 1,5 g de algodão em 30 mL de meio, 8 g de remanescente de casca de arroz em 20 mL de meio e 4 g de remanescente de bagaço de cana em 30 mL de meio.

Os cultivos para FSbSS continham 0,75 g de algodão em 30 mL de meio, 4 g de remanescente de casca de arroz em 20 mL de meio e 2 g de remanescente de bagaço de cana-de-açúcar em 30 mL de meio.

Os meios foram esterilizados por 20 minutos, a 121 °C, resfriados e inoculados em uma proporção de 4 % de volume de inóculo em volume de solução umedecedora.

A Tabela 6 apresenta os ensaios realizados nesta etapa:

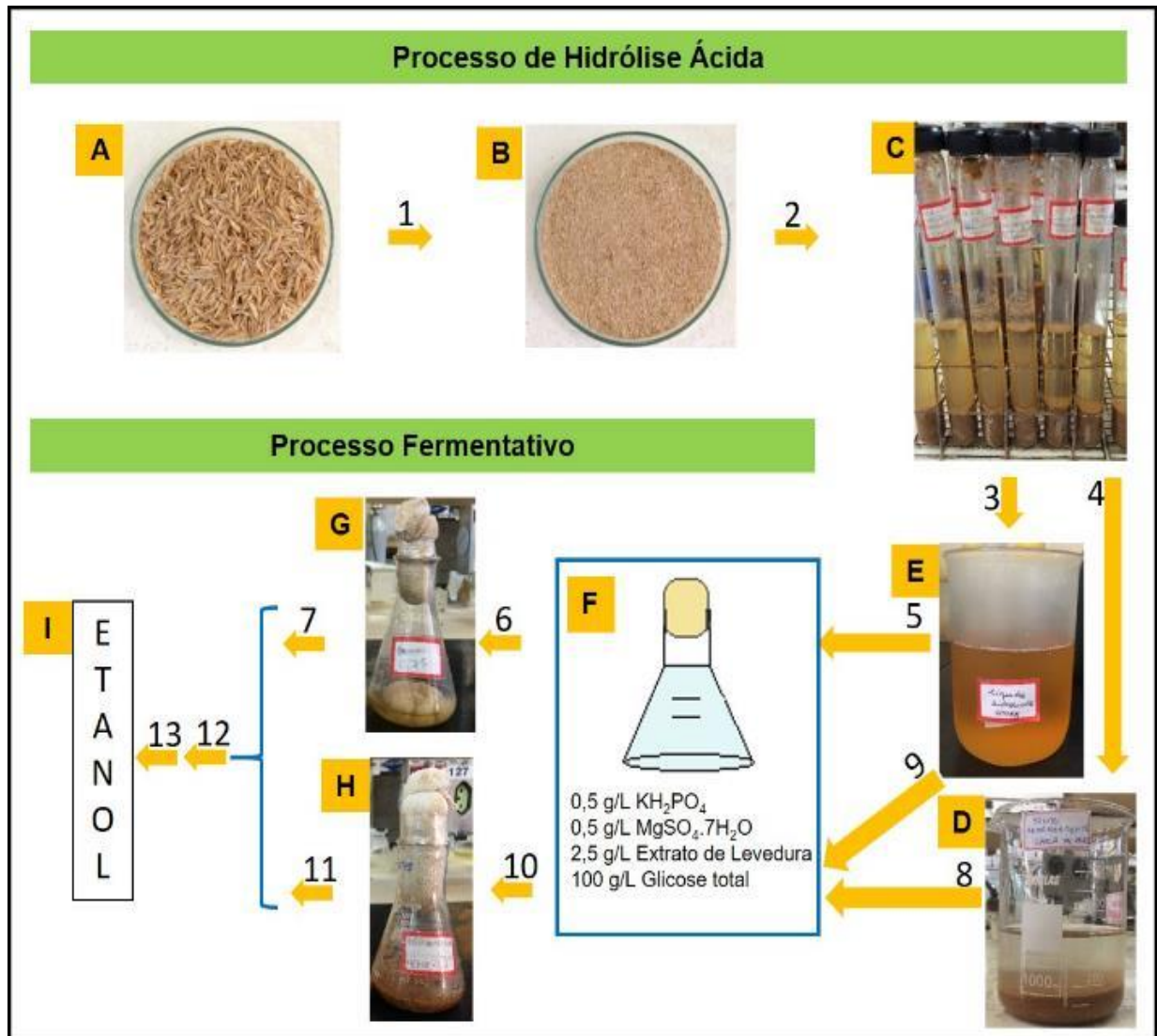
Tabela 6 - Ensaios comparando diferentes processos fermentativos com diferentes suportes sólidos

Substrato/ Composição do Ensaio	Tipo de fermentação	Volume de meio (mL)	Quantidade de suporte sólido utilizado (g)	Suporte sólido utilizado
Casca de Arroz/ Meio MB + Solução de Glicose + Hidrolisado de Casca de Arroz ((NH ₄) ₂ SO ₄ 25,5 mM).	Submersa (Fsb)	30	Não aplicável	Não aplicável
	Submersa na presença de suporte sólido (FSbSS).	30	0,75	Algodão
	Submersa na presença de suporte sólido (FSbSS)	20	4	Casca de arroz remanescente da hidrólise
	Sólida (FES)	30	1,5	Algodão
	Sólida (FES)	20	8	Casca de arroz remanescente da hidrólise
Bagaço de cana-de-açúcar/ Meio MB + Solução de Glicose + Hidrolisado de Bagaço de cana-de-açúcar ((NH ₄) ₂ SO ₄ 25,5 mM).	Submersa (Fsb)	30	Não aplicável	Não aplicável
	Submersa na presença de suporte sólido (FsbSS)	30	0,75	Algodão
	Submersa na presença de suporte sólido	30	2,027	Bagaço de cana-de-açúcar remanescente da hidrólise
	Sólida(FsbSS)	30	1,5	Algodão
	Sólida (FES)	30	4,054	Bagaço de Cana-de-açúcar remanescente da hidrólise

Fonte: O autor

A Figura 8 apresenta um fluxograma geral com parte do processo realizado para obtenção do etanol a partir de hidrolisado de material lignocelulósico.

Figura 8. Fluxograma geral do processo de produção de etano a partir de resíduos lignocelulósicos.



FONTE: O autor

Neste fluxograma, as letras representam os produtos e os números representam os processos. O processo 1 caracteriza-se pela moagem da casca de arroz ou do bagaço da cana-de-açúcar (produto A) levando ao produto casca de arroz triturada ou bagaço de cana-de-açúcar triturado (produto B). Na sequência, a casca de arroz triturada ou o bagaço de cana-de-açúcar triturado (produto B) é submetida a hidrólise com ácido sulfúrico (processo 2) obtendo-se o hidrolisado e o sólido remanescente (produtos C). O hidrolisado ácido é submetido ao processo de neutralização do pH com solução de hidróxido de amônio (processo 3), obtendo-se o

produto (E). O sólido remanescente é submetido ao processo de lavagem com água (processo 4), este processo é repetido de duas a quatro vezes, levando a obtenção do produto (D). Na sequência, o produto (E) é utilizado para a substituição parcial do meio de cultivo (produto F) nos processos fermentativos (processos 5 e 9). O sólido remanescente (produto D) é utilizado como suporte para os processos de fermentação em estado sólido (H) e fermentação submersa com presença de suporte sólido (G) (processos 6 e 7). Os processos 10 e 11 caracterizam-se pela fermentação submersa.

Os processos 12 e 13 demonstram a extração e quantificação do etanol, que é o produto final (I) do processo.

4.8. DETERMINAÇÃO DE ETANOL

Após o período de 24 horas de cultivo, os experimentos de fermentação submersa foram submetidos diretamente à centrifugação, e de FSbSS e FES foram inicialmente prensados manualmente, com posterior centrifugação. A partir do sobrenadante livre de células foi realizada a quantificação de etanol. As concentrações de etanol foram determinadas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE), equipado com detector de índice de refração (Shimadzu RID – 10A) e coluna HPX – 87H, 300 × 7,8 mm, operante a 60 °C com vazão de 0,7 mL/min de fase móvel (H₂SO₄ 0,005 mol/L). A quantificação foi realizada por padronização externa, com curva de calibração de padrão de etanol, nas concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 700 µg/mL e 1000 µg/mL.

4.9 DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DE SOMOGYI-NELSON

A determinação dos açúcares redutores e açúcares redutores totais foi realizada pelo método de Somogyi (1944) e Nelson (1945) utilizando uma curva padrão de glicose.

4.10 DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS PELO MÉTODO BRUX

A determinação dos sólidos solúveis em escala Brix (°Bx) (após hidrólise) foi realizada em refratômetro de Brix comparando com uma solução de sacarose como padrão.

4.11 DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS PELO MÉTODO DE FENOL-SULFÚRICO

A determinação dos açúcares redutores totais foi realizada pelo método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) utilizando-se uma curva padrão de glicose.

4.12 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA

O crescimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm relacionando-se a uma curva de biomassa.

4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada por Análise de Variância e teste de Tukey (teste de comparação de médias).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um processo de produção de etanol de segunda geração, por *Zymomonas mobilis* CP4, proveniente da substituição parcial dos meios de cultivo por hidrolisados de resíduos lignocelulósicos (casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar) em diferentes processos fermentativos (fermentação submersa, fermentação em estado sólido e fermentação submersa com presença de suporte sólido).

Os experimentos iniciais, descritos abaixo, foram realizados para se estabelecer um protocolo de obtenção de hidrolisado ácido de resíduos lignocelulósicos rico em açúcares fermentescíveis. Desse modo, hidrólises ácidas sequenciais de casca de arroz com diferentes concentrações de ácido sulfúrico e diferentes tempos de reação foram realizadas para se obter o referido protocolo. As condições de hidrólise definidas para a casca de arroz foram extrapoladas para o bagaço de cana-de-açúcar. Os hidrolisados obtidos foram neutralizados com hidróxido de amônio, e o sal de sulfato de amônio resultante, utilizado como fonte de nitrogênio nos diferentes processos fermentativos. Os remanescentes sólidos das hidrólises ácidas dos resíduos lignocelulósicos foram, eventualmente, utilizados como suporte sólido nas fermentações em estado sólido e submersa com suporte sólido.

5.1. HIDRÓLISE ÁCIDA DA CASCA DE ARROZ

Os resultados da hidrólise ácida da casca de arroz com diferentes concentrações de H_2SO_4 [massa de ácido por massa de casca de arroz (% , m/m)] durante 30 e 60 minutos (Tabelas 7 e 8, respectivamente), foram avaliados através de grau Brix ($^{\circ}Bx$) e também através da determinação de açúcares redutores totais (ART) (DUBOIS et al., 1956).

Os resultados obtidos pelo hidrolisado com 8 % de H_2SO_4 por 30 minutos resultou em maior liberação de açúcares com a menor porcentagem de ácido utilizado, quando avaliado pelo grau Brix (compare Tabelas 7 e 8). Note que está sendo considerada a avaliação pelo grau Brix (g/100g), já que hidrólises com concentrações superiores a 4 % de H_2SO_4 apresentaram uma concentração subestimada de ART quando determinadas pelo método de fenol-sulfúrico (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7- Hidrólise ácida de casca de arroz com diferentes concentrações de ácido sulfúrico por 30 minutos a 121 °C

Concentração de H ₂ SO ₄ (% m/m) ^A	Concentração de sólidos solúveis totais em grau Brix (°Bx) e açúcares redutores totais (ART - g/100g)	
	(g/100g) ^B	(ART - g/100g) ^B
H ₂ O	0,0±0,0	0,0±0,00
1 %	0,5±0,1	0,2±0,00
2 %	1,5±0,0	0,6±0,00
4 %	1,9±0,0	2,0±0,03
6 %	2,2±0,2	1,3±0,01
8 %	3,0±0,0	1,6±0,02
10 %	3,0±0,0	1,7±0,14

^A Concentração de H₂SO₄ em massa de ácido por massa de casca de arroz triturada. ^B As concentrações de sólidos solúveis totais em grau Brix (°Bx) e açúcares redutores totais em (ART - g/100g) são médias de duplicatas ± desvio padrão.

Tabela 8- Hidrólise ácida de casca de arroz com diferentes concentrações de ácido sulfúrico por 60 minutos a 121 °C

Concentração de H ₂ SO ₄ (% m/m) ^A	Concentração de sólidos solúveis totais em grau Brix (°Bx) e açúcares redutores totais (ART - g/100g)	
	(g/100g) ^B	(ART - g/100g) ^B
H ₂ O	0,0±0,0 ^b	0,1±0,00
1 %	0,2±0,0	0,2±0,04
2 %	0,8±0,0	0,2±0,00
4 %	1,8±0,2	2,1±0,16
6 %	1,9±0,3	0,8±0,08
8 %	2,4±0,4	1,0±0,00
10 %	3,0±0,1	1,5±0,16

^A Concentração de H₂SO₄ em massa de ácido por massa de casca de arroz triturada. ^B As concentrações de sólidos solúveis totais em grau Brix (°Bx) e açúcares redutores totais em (ART - g/100g) são médias de duplicatas ± desvio padrão.

Adicionalmente, foi realizada uma segunda etapa de hidrólise, com todos os sólidos pré-hidrolisados (remanescentes da primeira hidrólise – Tabelas 7 e 8) utilizando-se 8 % (m/m) de H₂SO₄ por 30 minutos (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 - Hidrólise ácida de pré-hidrolisados de casca de arroz provenientes de hidrólise com diferentes concentrações de ácido sulfúrico por 30 minutos

Amostras de casca de arroz pré-hidrolisada^A	Segunda Hidrólise Concentração sólidos solúveis (°Bx-g/100g)^B
H ₂ O	2,0±0,0
1 %	2,0±0,0
2 %	1,8±0,0
4 %	1,2±0,0
6 %	1,5±0,1
8 %	1,2±0,0
10 %	1,2±0,0

^A Sólidos residuais da primeira rodada de hidrólise, apresentada na Tabela 7; ^B As concentrações de sólidos solúveis totais em grau Brix (°Bx) são médias de duplicatas ± desvio padrão.

Tabela 10 - Hidrólise ácida de pré-hidrolisados de casca de arroz provenientes de hidrólise com diferentes concentrações de ácido sulfúrico por 60 minutos

Amostras de casca de arroz pré-hidrolisada	Concentração sólidos solúveis (°Bx g/100g) Segunda Hidrólise
H ₂ O	1,9±0,1
1 %	1,9±0,1
2 %	1,9±0,1
4 %	1,2±0,0
6 %	1,9±0,1
8 %	1,8±0,0
10 %	1,2±0,0

^A Sólidos residuais de primeira rodada de hidrólise, apresentada na Tabela 7; ^B As concentrações de sólidos solúveis totais em grau Brix (°Bx) são médias de duplicatas ± desvio padrão.

Em nosso estudo, a melhor combinação foi obtida com duas hidrólises sequenciais de 8 % (m/m) de H_2SO_4 por 30 minutos, resultando em maior liberação de açúcares com menor concentração de ácido (Tabela 7 e 9), tendo uma liberação de 3,0 e 1,2 g/100g de sólidos totais, na primeira e segunda hidrólises, respectivamente. Entretanto, optamos por seguir com apenas um passo de hidrólise, considerando a diluição que o material da segunda etapa provocaria no hidrolisado final.

5.2. HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

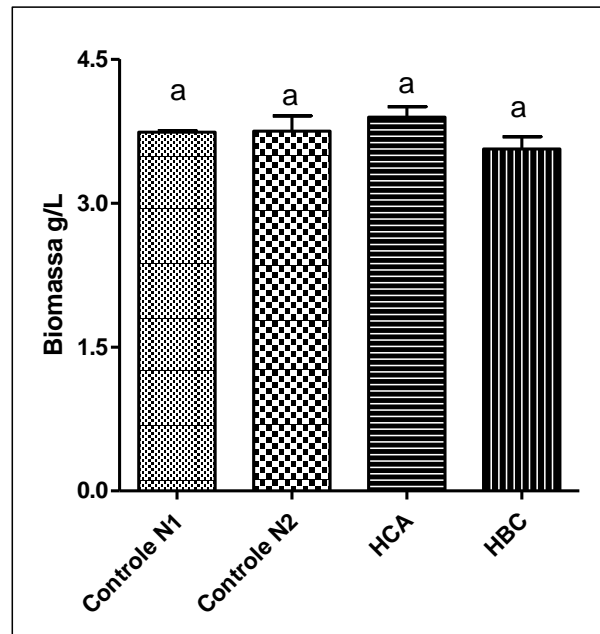
Como já relatado a melhor condição de hidrólise para a casca de arroz foi utilizada também na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (condição esta já descrita na literatura por KUMAR et al., (2015) e a concentração de sólidos solúveis obtido nesta condição foi de 3 % °Brix.

O tempo de hidrólise selecionado em nosso trabalho está em concordância com MORAIS & BROETTO (2012) que determinaram os tempos de 30 e 45 minutos como ideais para maior liberação de açúcares no bagaço de cana. Além disso, concentrações de 7,0 e 9,0 % de H_2SO_4 também se mostraram as mais eficientes. Entretanto, vale mencionar que esses autores realizaram um pré-tratamento do bagaço anterior à hidrólise ácida, facilitando a liberação de açúcares com a hidrólise ácida nessas condições, atingindo concentrações de 6,60 e 6,89 g/L de açúcares redutores.

5.3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DO MEIO DE CULTIVO POR HIDROLISADO ÁCIDO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ETANOL POR *Zymomonas mobilis*

Os hidrolisados ácidos obtidos tanto da casca de arroz como do bagaço de cana-de-açúcar [hidrólise com 8 % (m/m) massa de H_2SO_4 por massa de resíduo] por 30 minutos foram utilizados para avaliação da produção de biomassa e etanol por *Zymomonas mobilis* em fermentações submersas (Figuras 9 e 10, respectivamente).

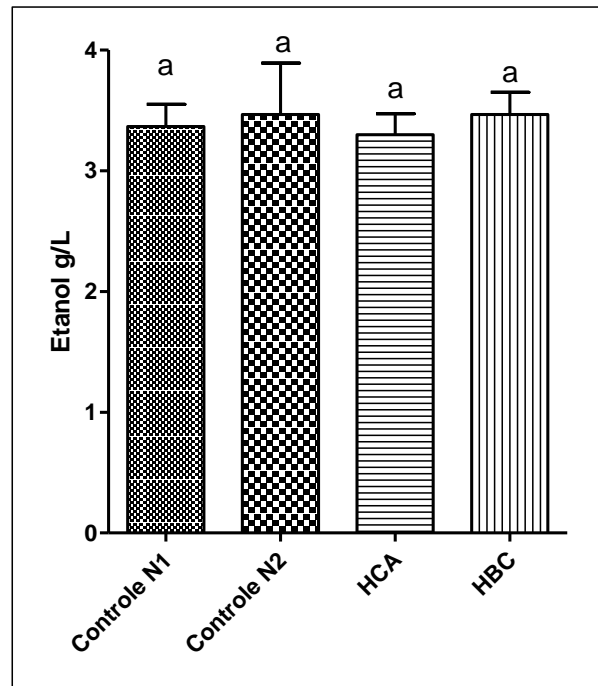
Figura 9 - Avaliação da biomassa de *Zymomonas mobilis* produzida por fermentações submersas na presença e ausência de hidrolisado em duas concentrações de nitrogênio.



Controle N1: ausência de hidrolisado ácido e 25,5 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Controle N2: ausência de hidrolisado ácido e 7,6 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; HCA: hidrolisado ácido de casca de arroz; HBC hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados estão representados são médias de triplicatas biológicas e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença estatística significativa em teste t, $p > 0,05$.

Nestes experimentos foi avaliada a presença e a ausência de hidrolisado, além de duas concentrações da fonte nitrogênio (sulfato de amônio). Esta avaliação é importante para verificação de possíveis influências da presença do hidrolisado e de um excesso de fonte de nitrogênio no crescimento bacteriano e na produção de etanol no modelo de processo proposto. Note que o excesso de fonte de nitrogênio (25,5 mM) é proveniente do passo de neutralização do hidrolisado ácido e apresenta-se na forma de sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. Ambos os fatores avaliados (i.e., presença de hidrolisado e excesso de fonte de nitrogênio) não apresentaram diferença estatística significativa na produção de biomassa (Figura 9) e na produção de etanol (Figura 10).

Figura 10 - Avaliação da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* em fermentações submersas na presença e ausência de hidrolisado e em duas concentrações de nitrogênio.



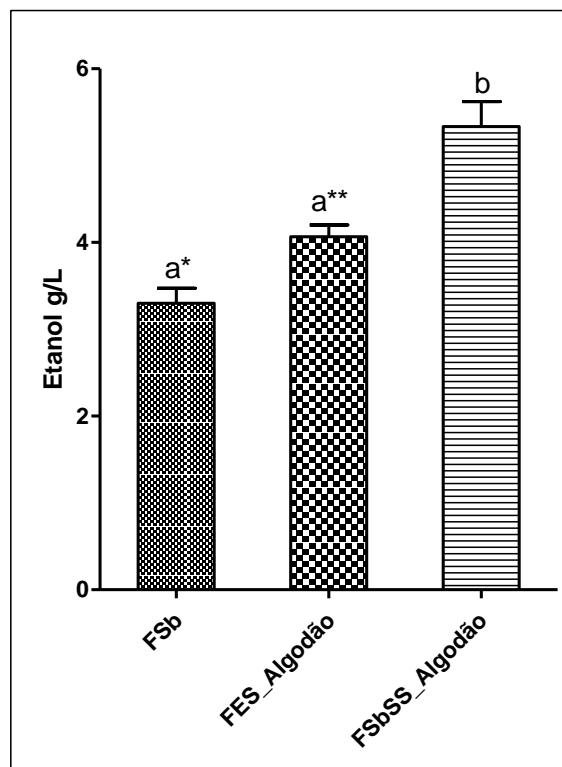
Controle N1, ausência de hidrolisado ácido e 25,5 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Controle N2, ausência de hidrolisado ácido e 7,6 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; HCA, hidrolisado ácido de casca de arroz; HBC, hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 20 mL de meio de fermentação contendo concentração final de 10 % m/v de glicose (glicose adicionada + hidrolisado) incubados a 30 °C e 100 rpm por 24 horas. Os resultados representados são médias de triplicatas biológicas e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença estatística significativa em teste t, $p > 0,05$.

Os resultados obtidos sugerem a viabilidade da utilização da substituição parcial do meio de cultivo por hidrolisados ácidos de casca de arroz e de bagaço de cana-de-açúcar. Os próximos experimentos foram realizados com o intuito de se testar esta substituição parcial em diferentes processos fermentativos, i.e., fermentação submersa (FSb), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa com presença de suporte sólido (FSb-SS).

5.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DO MEIO DE CULTIVO POR HIDROLISADO ÁCIDO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS POR DIFERENTES PROCESSOS FERMENTATIVOS

A comparação de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* através de três diferentes processos fermentativos [(1) fermentação submersa (FSb), (2) fermentação em estado sólido utilizando algodão como suporte (FES_Algodão) e (3) fermentação submersa com presença de algodão como suporte sólido (FSbSS_Algodão)] pode ser vista na Figura 11. Note que se utilizou uma substituição parcial do meio de cultivo por hidrolisado ácido de casca de arroz nos três processos fermentativos. A presença de um suporte sólido na fermentação submersa proporcionou um aumento significativo na produção de etanol quando comparado com ambos ($p < 0,05$ quando comparado com a FES_Algodão e $p < 0,01$ quando comparado com a FSb).

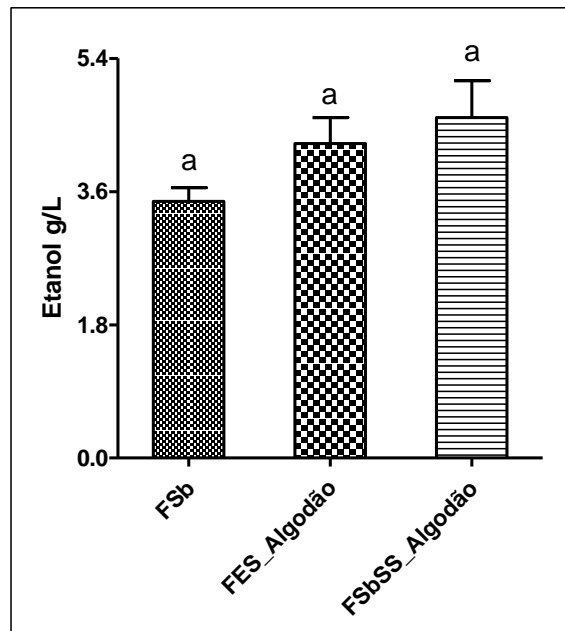
Figura 11 - Avaliação da produção de etanol por *Zymomonas mobilis*, por diferentes processos fermentativos, utilizando meio de cultivo parcialmente substituído por hidrolisado de casca de arroz.



FSb, fermentação submersa; FES_Algodão, fermentação em estado sólido utilizando algodão como suporte sólido; FSbSS_Algodão, fermentação submersa com presença de substrato sólido (algodão). Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 20 mL de meio de fermentação contendo concentração final de 10 % m/v de glicose (glicose adicionada + hidrolisado) incubados a 30 °C e 100 rpm por 24 horas. Os resultados representados são médias de triplicatas biológicas e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença estatística significativa em teste t, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

A comparação da produção de etanol por *Z. mobilis*, nos três diferentes processos fermentativos (FSb, FES_Algodão e FSbSS_Algodão) a partir da substituição parcial do meio de cultivo por hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar, pode ser vista na Figura 12. Neste caso a presença de um suporte sólido em ambos (FES e FSbSS_Algodão) não proporcionou um aumento significativo na produção de etanol.

Figura 12 - Avaliação da produção de etanol por *Zymomonas mobilis*, por diferentes processos fermentativos, utilizando meio de cultivo parcialmente substituído por hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

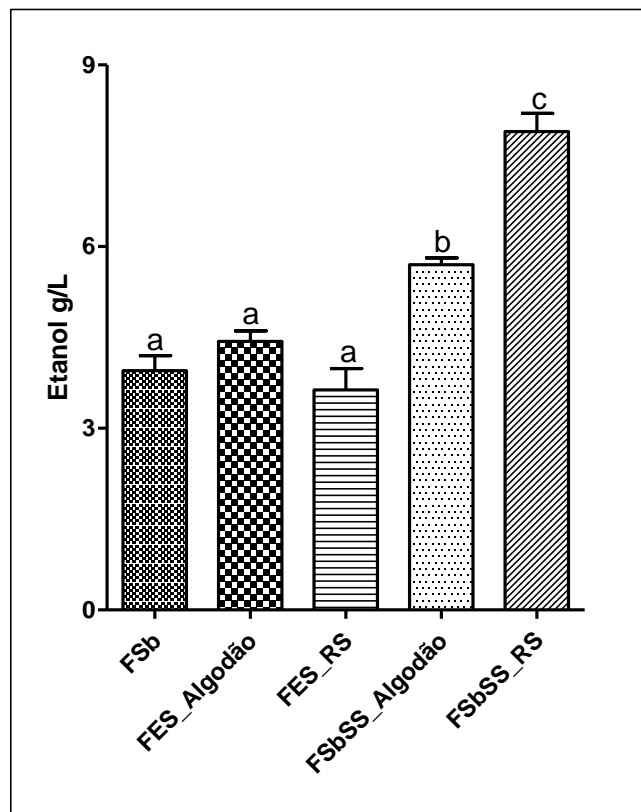


FSb, fermentação submersa; FES_Algodão, fermentação em estado sólido utilizando algodão como suporte sólido; FSbSS_Algodão, fermentação submersa com presença de substrato sólido (algodão). Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 20 mL de meio de fermentação contendo concentração final de 10 % m/v de glicose (glicose adicionada + hidrolisado) incubados a 30 °C e 100 rpm por 24 horas. Os resultados representados são médias de triplicatas biológicas e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença estatística significativa em teste t, $p > 0,05$.

5.5 - PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO ÁCIDO DE CASCA DE ARROZ UTILIZANDO REMANESCENTE SÓLIDO DA HIDRÓLISE COMO SUBSTRATO SÓLIDO POR FERMENTAÇÕES EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA COM PRESENÇA DE SUBSTRATO SÓLIDO

Uma comparação dos níveis de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* obtida através dos três diferentes processos fermentativos pode ser vista na Figura 13. No entanto, adicionalmente avaliou-se a substituição do algodão, utilizado como suporte sólido tanto para o processo de fermentação em estado sólido (FES) como para o processo de fermentação submersa com presença de um substrato sólido (FSbSS), pelo sólido remanescente (resíduo) da hidrólise ácida da casca de arroz.

Figura 13 - Avaliação da produção de etanol a partir de hidrolisado ácido de casca de arroz utilizando remanescente sólido da hidrólise como substrato sólido por fermentações em estado sólido e submersa com presença de substrato sólido.



FSb, fermentação submersa; FES_Algodão, fermentação em estado sólido utilizando algodão como suporte sólido; FES_RS, fermentação em estado sólido utilizando remanescente sólido da hidrólise ácida da casca de arroz como suporte sólido; FSbSS_Algodão, fermentação submersa com presença de substrato sólido (algodão); FSbSS_RS, fermentação submersa com presença de substrato sólido (remanescente sólido da hidrólise ácida da casca de arroz). Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 20 mL de meio de fermentação contendo concentração final de 10 % m/v de glicose (glicose adicionada + hidrolisado) incubados a 30 °C e 100 rpm por 24 horas. Os resultados representados são médias de triplicatas biológicas e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença estatística significativa em teste t, b vs a $p < 0,05$ e c vs a $p < 0,01$.

Não houve diferença significativa entre as comparações da fermentação submersa com as fermentações em estado sólido para ambos os suportes sólidos. No entanto, as fermentações submersas com presença de suporte sólido, algodão ou sólido remanescente, apresentaram um incremento estatisticamente significativo quando comparado com outros dois processos. A substituição do algodão pelo resíduo como suporte sólido provocou um novo aumento na produção de etanol para as FSbSS ($p < 0,01$). Confirmando que as fermentações submersas com presença de suporte sólido são uma alternativa de grande potencial para produção industrial de etanol, principalmente quando estas utilizam os sólidos remanescentes de hidrólise de resíduos lignocelulósicos.

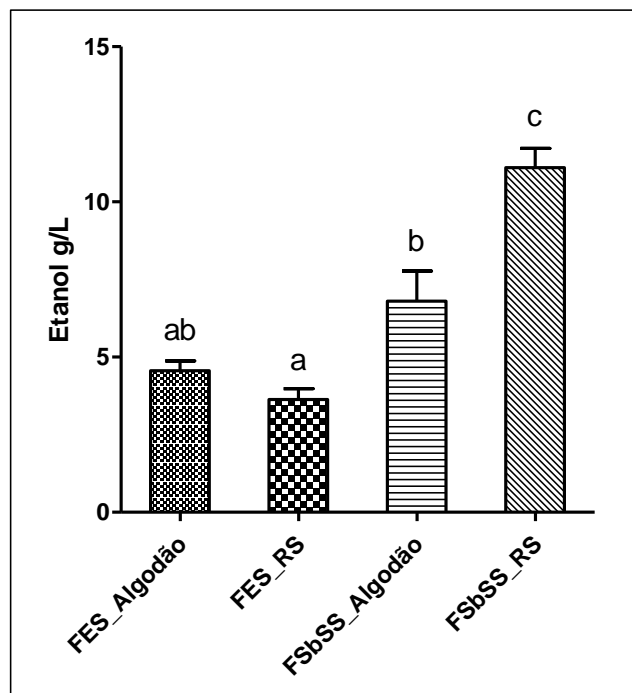
A literatura é pobre em relatos de produções de etanol em FES e FSbSS, porém resultados de fermentações submersas utilizando hidrolisados ácidos no meio de cultivo podem ser encontrados. SIVASAKTHIVELAN et al., (2014) obtiveram produção de 13,59 g/L de etanol por *Zymomonas mobilis*, a partir de hidrolisado ácido do resíduo de semente de girassol em fermentação submersa, resultado superior ao encontrado em nosso trabalho, porém estes autores utilizaram um tempo de fermentação superior (48 horas).

LUJÁN- RHENALS et al., (2015), utilizaram hidrolisado ácido do farelo de soja em fermentação submersa durante 20 horas por *Zymomonas mobilis* NRRL B-4286 com produção de 9,2 g/L de etanol. TODHANAKASEM et al., (2014), avaliaram a produção de etanol utilizando as estirpes *Zymomonas mobilis* ZM4, TISTR 405, 548, 550 e 551 com hidrolisado de farelo de arroz obtido através de hidrólise básica (KOH), ácida (H_2SO_4) seguido de hidrólise enzimática em fermentação com presença de biofilme. A *Zymomonas mobilis* ZM4 foi quem obteve o melhor resultado com 13.40 ± 2.43 g/L após 4 dias de fermentação. Considerando as diferenças entre as estirpes e os maiores tempos de fermentação encontrados na literatura, podemos considerar satisfatória a produção de etanol encontrada em nosso trabalho utilizando hidrolisado ácido de casca de arroz.

5.6 - PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO ÁCIDO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO REMANESCENTE SÓLIDO DA HIDRÓLISE COMO SUBSTRATO SÓLIDO POR FERMENTAÇÕES EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA COM PRESENÇA DE SUBSTRATO SÓLIDO

Uma nova comparação dos níveis de produção de etanol por *Z. mobilis* obtidos nos diferentes processos fermentativos foi realizada, como apresentado na Figura 14, agora avaliando a substituição do algodão, utilizado como suporte sólido tanto para o processo de fermentação em estado sólido (FES) como para o processo de fermentação submersa com presença de um suporte sólido (FSbSS), pelo sólido remanescente (resíduo) da hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 14 - Avaliação da produção de etanol a partir de hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar utilizando remanescente sólido da hidrólise como substrato sólido por fermentações em estado sólido e submersa com presença de substrato sólido.



FES_Algodão, fermentação em estado sólido utilizando algodão como suporte sólido; FES_RS, fermentação em estado sólido utilizando remanescente sólido da hidrólise ácida do bagaço de cana como suporte sólido; FSbSS_Algodão, fermentação submersa com presença de substrato sólido (algodão); FSbSS_RS, fermentação submersa com presença de substrato sólido (remanescente sólido da hidrólise ácida de bagaço de cana). Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 30 mL de meio de fermentação contendo concentração final de 10 % m/v de glicose (glicose adicionada + hidrolisado) incubados a 30 °C e 100 rpm por 24 horas. Os resultados representados são médias de triplicatas biológicas e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença estatística significativa em teste t, b vs a $p < 0,05$; c vs a $p < 0,001$ e b vs c $p < 0,01$.

Não houve diferença significativa entre as fermentações em estado sólido para ambos os suportes sólidos. No entanto, as fermentações submersas com presença de suporte sólido, algodão ou sólido remanescente, apresentaram um incremento estatisticamente significativo quando comparado com a FES. A substituição do algodão pelo resíduo proporcionou um incremento significativo na produção de etanol ($p < 0,01$). Este resultado sugere que as fermentações submersas com presença de suporte sólido são uma alternativa de grande potencial para produção de etanol, principalmente quando estas utilizam os sólidos remanescentes de hidrólise de resíduos lignocelulósicos.

JEON et al. (2010), avaliaram oito resíduos lignocelulósicos (dentre eles: casca de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, sorgo, pinus, eucalipto, etc) com tratamento ácido (H_2SO_4 à 2 %, a 134 °C, 60 minutos) e posterior hidrólise enzimática. As maiores produções de etanol à partir da *Zymomonas mobilis* foram alcançadas com a palha do trigo (13,8 g/L) e hidrolisado de bagaço de cana (17,7 g/L) em fermentação submersa. A hidrólise ácida com posterior hidrólise enzimática contribuiu para liberação dos açúcares fermentescíveis e pode ter impactado na produção superior de etanol ao encontrado na presente dissertação.

O fato das maiores produções de etanol terem ocorrido nas FES e FSbSS, ou seja, quando um suporte sólido estava presente pode ser atribuída a formação de biofilme. Apesar de não ter sido avaliada a formação de biofilme, experimentalmente, há relatos na literatura de formação de biofilme por cepas de *Zymomonas mobilis* quando um suporte sólido está presente, e que este contribui para um aumento na formação de etanol. TODHANAKASEN et al., (2014) demonstraram que diferentes cepas da *Zymomonas mobilis* (ZM4, TISTR 405, 548, 550 e 551) utilizadas na bioconversão de farelo de arroz hidrolisado à etanol, formaram biofilme nas superfícies de plástico. Uma análise microscópica revelou que a cepa ZM4 desenvolveu uma estrutura de biofilme homogênea e grossa em 24 horas. A porcentagem de células vivas em biofilmes foi maior do que para as células planctônicas ($54,32 \pm 7,10$ % vs $28,69 \pm 3,03$ %), sugerindo que os biofilmes serviram como um nicho protetor para o crescimento de bactérias na presença de inibidores tóxicos do hidrolisado de farelo de arroz. A atividade metabólica de ZM4 crescido como um biofilme também foi maior do que a mesma estirpe crescida planctonicamente, medida pela produção de etanol ($13,40 \pm 2,43$ g/L vs $0,432 \pm 0,29$ g/L, respectivamente).

TODHANAKASEN et al, 2016 demonstraram a formação de biofilme por *Zymomonas mobilis* em diferentes tipos de carreadores. Este estudo investigou os biofilmes formados pelas estirpes TISTR 551 e ZM4 e observou que estirpe TISTR551 foi capaz de formar biofilme, utilizando cabelo de milho como suporte, após 3 dias de fermentação.

5.7- CORRELAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL E O CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES NOS DIFERENTES PROCESSOS FERMENTATIVOS

O consumo percentual de açúcares redutores dos diferentes processos fermentativos, com presença e ausência de hidrolisado lignocelulósico, foi avaliado no final de cada cultivo (Tabela 11). As maiores taxas de consumos foram observadas nos cultivos com ausência de hidrolisado, sugerindo que o hidrolisado possa de alguma forma inibir o consumo de açúcares. Enquanto que, as menores taxas de consumo ocorreram nos cultivos em estado sólido.

De maneira geral houve uma variação considerável na taxa de consumo de açúcares redutores (36 % até 78 %), entretanto não foi possível traçar qualquer relação entre estes resultados e a produção de etanol.

Tabela 11 - Consumo percentual de açúcares redutores nos diferentes processos fermentativos com presença e ausência de hidrolisados lignocelulósicos

Hidrolisado	Fermentação	Etanol (g/L)	Consumo percentual de açúcares redutores(g/L)
Controle (ausência de hidrolisado)	Submersa	3,40±0,26	77,60±3,69
	Submersa com substrato sólido algodão	3,70±0,12	76,40±0,91
	Sólida	2,70±0,17	69,10±4,90
Hidrolisado de bagaço de cana	Submersa	3,50±0,25	66,00±0,91
	Submersa com substrato sólido algodão	4,60±0,52	49,60±1,36
	Sólida	5,10±1,18	41,00±1,51
Hidrolisado de casca de arroz	Submersa	3,30±0,25	63,50±0,54
	Submersa com substrato sólido algodão	5,60±0,22	65,30±3,48
	Sólida	4,10±0,19	36,10±1,27

Os resultados representados são médias de triplicatas e as barras de erro representam o desvio padrão.

6. CONCLUSÃO

Pelos resultados encontrados podemos concluir que a melhor condição para obtenção de um hidrolisado foi com a utilização de H_2SO_4 a 8 % (m/m) durante 30 minutos, para a casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar. A presença do hidrolisado ácido no meio de fermentação não influenciou significativamente a produção de biomassa e de etanol por *Zymomonas mobilis* podendo ser utilizado como substituinte parcial do meio de fermentação.

A utilização de diferentes suportes sólidos (algodão e resíduo remanescente do bagaço de cana e da casca de arroz) nas FES e FSbSS promoveu um aumento na produção de etanol.

O processo fermentativo do tipo submerso com presença de suporte sólido demonstrou o melhor resultado dentre os processos avaliados, sendo que a maior produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CP4 foi observada com a fermentação submersa com suporte sólido de resíduo lignocelulósico.

7. REFERÊNCIAS

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. **Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse**. Journal of Food Engineering, v. 5, n. 4, 2002.

ACEA, Alliance, EMA, JAMA. **World wide fuel charter. 4th ed.** Disponível em: <http://www.acea.be/index.php/files/final_wwfc_4_sep_2006pdf/> Acesso em: 22/11/2016.

AKHTAR, N.; GUPTA, A.; GOYAL, A.; GOYAL, A. A. **Recent Advances in Pretreatment Technologies for Efficient Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass**. Environmental Progress & Sustainable Energy, p. 1-23, out. 2015.

BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M.; ZACCHI, G. (2006) **Direct Catalytic Hydrogenation of Bioethanol-from-Sugarcane Bagasse Effluents over Ru/C Catalyst: An Eco-Efficient Environmentally-Friendly Approach**. In: XX Simpósio Ibero-Americano de Catálise, Gramado/ RS. Anais XX SICAT.

BETANCUR, G. J. V & PEREIRA, Jr. N. **Sugarcane bagasse as feedstock for second generation ethanol production**. Part I: diluted acid pre-treatment optimization. Electronic Journal of Biotechnology, 2010.

BEKERS, M. et al. **Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment**. Process Biochemistry, v.36, n. 1, p. 979-986, 2001.

BRAZ, Carlos Eduardo Mendes. **Caracterização de biomassa lignocelulósica para uso em processos térmicos de geração de energia**. 2014. 115 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2014.

CAMILIOS NETO, D. C.; BUZATO, J. B.; PEDRINE, M. A.; CELLIGOI, C.; OLIVEIRA, M. R. **Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na**

fermentação do melaço de cana-de-açúcar. Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 26, n. 1, p. 17-22, 2005.

CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J. **Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities.** Bioresour Technol, v. 98, p. 2415-2457, 2007.

CHENG, K. et al. **Sugarcane bagasse hemicelluloses hydrolysate for ethanol production by acid recovery process.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 38, p. 105–109, 2008.

CHIARAMONTI, D. et al. **Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovation method.** *Biomass Bioenergy* v. 46, p. 25-35, 2012.

CLASSES MIDLANDSTECH. **Microbial Metabolism.** Disponível em: <<http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap05/lecture4.htm>>. Acesso em: 22/11/2016.

CONAB. Acomp. safra bras. grãos. **Safra 2015/16 - Décimo Primeiro levantamento**, Brasília. v. 11, p. 1-176, ago. 2016.

COUTO, S.; SANROMAN, M. **Application of solid-state fermentation to food industry – a review.** *Journal of Food Engineering*, London, v. 76, n. 3, p. 291-302, out. 2006.

DEMIRBAS, A. **Energy and environmental issues relating to greenhouse gas emissions in turkey.** *Energy Convers Manage*, v.44, p. 201-213, 2013.

DIONISI, D. et al. **The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: a review.** *J Chem Technol Biotechnol*, v .90, p. 366–383, out. 2014.

DUBOIS, M. et al. **Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.** *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350-356, 1956.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. **Zymomonas mobilis: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica.** *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 30, n. 2, p. 361-380, abr./jun. 2009.

FURLAN, V. J. M. **Produção de bioetanol a partir de resíduos celulósicos da agroindústria do arroz.** 2009. 92f. Dissertação (Programa de PósGraduação em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande – RS.

GUNASEKARAN, P.; RAJ, K. C. **Ethanol fermentation technology: Zymomonas mobilis.** *Current Science*, v. 77, p. 156–168, 1999.

HICKERT, L.R. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (Oryza sativa) e a avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras,** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. 2011.

HOMBACH, L. E. et al. **Optimal design of supply chains for second generation biofuels incorporating European biofuel regulations.** *Journal of Cleaner Production*, v. 133, p. 565-575, mai. 2016.

HSU, T. A. **Pretreatment of biomass.** In: Wyman, C. E., editor. **Handbook on bioethanol: production and utilization.** Washington DC: Taylor & Francis, ISBN 1-56032-553-4; p. 179-212, 1996.

IEA, **Internacional Energy Agency (2015).** Disponível em: <<http://www.geografiaparatodos.com.br>>. Acesso em: 22/11/2016.

JEON, Y. J.; XUN, Z.; ROGERS, P. L. **Comparative evaluations of cellulosic raw materials for second generation bioethanol production.** *Letters in Applied Microbiology* 51, 518–524, 2010.

JONKER, J.; et al. **Outlook for ethanol production costs in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies.** Applied Energy, v. 147, p. 593–610, 2015.

KANG, Q. et al. **Energy-Efficient Production of Cassava-Based Bio-Ethanol.** Advances in Bioscience and Biotechnology, v. 5, n. 12, 2014.

KREMER, T. et al. **N₂ gas is an effective fertilizer for bioethanol production by *Zymomonas mobilis*.** Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1420663112. Acesso em: 27 de junho de 2016.

KNAUF, M. & MONIRUZZAMAN, M. **Lignocellulosic Biomass Processing: A Perspective.** International Sugar Journal, v. 106, p. 12-23, 2004.

KUMAR, C. G. **Significance of microbial biofilms in food industry: a review.** International Journal of Food Microbiology, v. 42, p. 9-27, 1998.

KUMAR, S.; DHEERAN, S.; SINGH S. P.; MISHRA, I. M.; ADHIKARI D.K. **Kinetic studies of two-stage sulphuric acid hydrolysis of sugarcane bagasse.** Renewable Energy 83 p. 850-858, 2015.

LI, P. et al. **Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production.** Bioresource Technology, v. 206, p. 86-92, jan. 2016.

LI, X. Z. et al. **Enhanced benzaldehyde tolerance in *Zymomonas mobilis* biofilms and the potential of biofilm applications in fine-chemical production.** Appl. Environ. Microbiol., **72**, 1639–1644, 2006.

LIAO J. C. et al. **Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels.** Nat. Rev. Microbiol. 14, 288–304. 10.1038/nrmicro.2016.32, 2016.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. **Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects.** Progress in Energy and Combustion Science, v. 38, p. 449-467, abr. 2012.

LIN, Y.; TANAKA, S. **Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 69, p. 627-642, 2006.

LUJÁN-RHENALS, D. E. et al **Fermentation of Soybean Meal Hydrolyzates with *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* for Ethanol Production.** Journal of Food Science_Vol 80, Nr.7, 2015

MACHADO, C. M. M., ABREU, F. R. **Produção de álcool combustível a partir de carboidratos.** Revista da Política Agrícola, Ano XV, Nº 3, Jul./Ago./Set., 2006.

MARTÍN, C. et al. **Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse.** Enzyme and microbial Technology, v.40, p. 426-432, 2007.

MF Rural. Disponível em: < <http://www.mfrural.com.br/detalhe/casca-de-arroz-144195.aspx>>. Acesso em: 22/11/2016.

MAZAHARI, D. et al.,**Bioethanol production from carob pods by solid-state fermentation with *Zymomonas mobilis*.** Applied Energy, v.99, p. 372–378, 2012.

MITCHELL, D. et al. **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation.** 1. ed. Heidelberg: Springer, 2006, v. 1, 450p.

MORAIS, A.P.S.; BROETTO, F. **Pré-hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e sua caracterização físico-química.** Energia na Agricultura, v. 27, n. 4, p. 1-12, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/137260>>.

NELSON, N. **A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose.** J.Biol.Chem. , v. 153, p. 375-80, 1944.

PEREIRA JR., N. (2008) **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery**. In. series on biotechnology. Ed. Nei Pereira Jr. Amiga Digital. Escola de Química/UFRJ. ISBN 978-85-903967-3-4.

RANATUNGA, T. D. Et al. **Identification inhibitory componentes toxic toward *Zymomonas mobilis* CP4 (pZB5) xylose fermentation**. Appl. Biochem. Biotechnol., v. 67, p. 185-198, 1997.

RFA, **Renewable Fuels Association (2016)**. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/>>. Acesso em: 20/12/2016.

ROCHA, C. R. **Aplicação de micro-ondas para parboilização de arroz**. Campinas, 1998, 71f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1998. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000131802&fd=y>> Acesso em: 21/05/2016

ROGERS P; et al.: **Ethanol Production by *Zymomonas mobilis***. Microbial reactions, p. 37–84,1982.

SAKAI, S.; TSUCHIDA, Y.; NAKAMOTO, H.; OKINO, S.; ICHIHASHI, O.; KAWAGUCHI, H.; et al. **Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum***. R. Appl. Environ. Microbiol., v. 73, p. 2349-2353, 2007.

SANTOS, D. S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. 2012. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012.

SANTOS, F. A. et al. **Potencial Da Palha De Cana-De-Açúcar Para Produção De Etanol**. Química Nova, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, jan. 2012.

SARKAR, N. et al. **Bioethanol production from agricultural wastes: An overview.** Renewable Energy, v. 37, p. 19-27, 2012.

SCHMIDT, A. et al. **Effect of alcohols and Temperature on the Hopanoid Content of *Zymomonas mobilis*.** Chem. Eng. Technol., v. 17, n. 10-20, 1986.

SIVASAKTHIVELAN, P. et al. **Production of Ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* using Sunflower Head Wastes - A Comparative Study.** International Journal of Microbiological Research 5 (3): 208-216, 2014

SOCCOL C. R. et al. **Lignocellulosic bioethanol: current status and future perspectives, in Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes.** ed. Elsevier, Amsterdam, p. 101–122, 2011.

SOMOGY, M. A New Reagent for Determination of Sugars. **A new Sugar Reagent,** May p. 61 — 68, 1945.

SUN, Y. & CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** Bioresource Technology, v. 83, n.1, p. 1-11,2002.

SWINGS, J; DE LEY, J. **The biology of *Zymomonas*.** Bacteriological reviews, v. 41 (1), p.1–46, 1977.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. **Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production. A review.** Int. J. Mol. Sci., v. 9, p. 1621-1651, set. 2008.

TODHANAKASEM, T.; TIWARI, R. ***Zymomonas mobilis* biofilm formations on different types of carriers.** Disponível em https://www.researchgate.net/publication/301696331_Zymomonas_mobilis_biofilm_formation_on_different_types_of_carriers>. Acesso em 02 de julho 2017.

TODHANAKASEM, T. et al. **Biofilm production by *Zymomonas mobilis* enhances ethanol production and tolerance to toxic inhibitors from rice bran hydrolysate.** New Biotechnology, v. 31, n. 5, p. 451-459, set. 2014.

TRISTEZZA, M. **Susceptibility of wine spoilage yeasts and bacteria in the planktonic state and in biofilms to disinfectants**". Annals of Microbiology 60, p 549-556, 2010.

Usina São Domingos. Disponível em: <
<http://www.usinasaodomingos.com.br/site/?pagina=bagaco>>. Acesso em:
 22/11/2016.

WILDE, H. P. J.; LONDO, H. M. **Market analysis biofuels: Implications for the armed forces in the Netherlands.** Energy research Centre of the Netherlands, set. 2009.

WILLÖR, S. et al, **Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides– A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques.** Industrial Crops and Products, v. 29, p. 571–580, 2009.

YANG, B.; WYMAN, C. E. **Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol.** Biofuel Bioprod Biorefin, v. 2, p. 26-40, 2008.

ZHOU, S. et al. **Improving ethanol production from alfafa stems via ambiente-temperature acid pretreatment and washing.** Bioresource Technology, v. 170, p. 286-292, ago. 2014.