

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS

PHILIFE LUAN BRITO

**FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO ÁCIDO HEMICELULÓSICO DA
TORTA DE DENDÊ (*Elaeis guineensis*) TRATADO COM DIFERENTES
MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO**

Diamantina

2016

PHILIPPE LUAN BRITO

**FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO ÁCIDO HEMICELULÓSICO DA
TORTA DE DENDÊ (*Elaeis guineensis*) TRATADO COM DIFERENTES
MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis *Stricto Sensu* da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos

Coorientadora: Prof. Dra. Lílian de Araújo Pantoja

Diamantina

2016

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

B862f

Brito, Philipe Luan

Fermentação do hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê
(*Elaeis guineensis*) tratado com diferentes métodos de destoxificação /
Philipe Luan Brito. – Diamantina, 2016.

85 f. : il.

Orientador: Alexandre Soares dos Santos

Coorientadores: Lilian de Araújo Pantoja

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em
Biocombustíveis) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
Mucuri.

1. Bioetanol. 2. Hemicelulose. 3. Hidrólise ácida.
4. *Scheffersomyces stipitis*. I. Título. II. Universidade Federal dos
Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 662.6

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PHILIFE LUAN BRITO

**FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO ÁCIDO HEMICELULÓSICO DA
TORTA DE DENDÊ (*Elaeis guineensis*) TRATADO COM DIFERENTES
MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos

Data de aprovação ____/____/____.

Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos (Presidente) UFVJM

Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino (Membro) UFOP

Prof. Dr. Ronnie Von dos Santos Veloso (Membro) UFVJM

Diamantina

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Antonieta e Eloízio, que sempre acreditaram em mim, pelo amor e apoio em todos os momentos da minha trajetória, pela educação e direcionamento.

Aos meus irmãos, Dyego e Ló, por todo incentivo e por acreditarem no meu sucesso!

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Alexandre Soares e Profa. Dra. Lílian Pantoja, por terem me acolhido no laboratório, pela educação profissional e confiança depositada em mim.

Agradeço à FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos, ao CNPq pelo fomento e à UFVJM pelo apoio estrutural e pedagógico.

À empresa AGROPALMA que gentilmente cedeu a torta de dendê para realização deste trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis por todo embasamento teórico e prático e a todos os colegas do Programa.

Agradeço a toda equipe do LabVin e LabBio! Sem vocês nada disso seria possível, obrigado pela amizade e ajuda. Em especial a Gabriela que me auxiliou durante os processos fermentativos

Aos amigos que estão em Diamantina e aos que se espalharam por Minas, pelo Brasil e pelo Mundo!

Muito obrigado!!!

Agradeço a Deus pelo dom da vida!

RESUMO

Nas últimas décadas tem se intensificado o estudo de estratégias que proporcionem melhores rendimentos em etanol a partir do uso de biomassas lignocelulósicas. Neste trabalho foi utilizado o resíduo agroindustrial do processo de beneficiamento do óleo do dendê (*Elaeis guineensis*) para obtenção de um hidrolisado ácido hemicelulósico para posterior fermentação. O hidrolisado foi obtido através da utilização de ácido sulfúrico diluído o qual se mostrou eficiente na solubilização da hemicelulose. Três métodos de destoxificação dos inibidores foram testados dentre os quais se destacaram os tratamentos por carvão ativado e a combinação do tratamento empregando *overliming* e carvão ativado, com remoção de compostos fenólicos, furfural e 5-hidroximetilfurfural acima de 90% do hidrolisado. As linhagens de *Scheffersomyces stipitis* NRRLY 1214 e NRRLY 7124 apresentaram os maiores valores de etanol, com valores correspondentes de 6,2 e 6,13 g L⁻¹, no meio destoxificado por *overliming* com suplementação. Estas linhagens, neste mesmo meio, alcançaram as maiores taxas de Yp/s (0,32 e 0,33) e Ef (64,46 e 64,89%). Os dados obtidos corroboram que as linhagens estudadas apresentam potencial para a fermentação da fração hemicelulósica da torta de dendê. O uso de meio de hidrolisado ácido da torta de dendê, sem suplementação, se mostra inviável nas condições testadas, pois reflete em valores insignificantes de etanol. Os dados obtidos contribuirão de forma positiva no aproveitamento de resíduos agroindustriais, bem como para os avanços na área de obtenção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: Bioetanol. Hemicelulose. Hidrólise ácida. *Scheffersomyces stipitis*.

ABSTRACT

In recent decades, the study of strategies that provide better yields in ethanol from lignocellulosic biomass has intensified. In this study we used the agroindustrial residue from the palm oil milling process (*Elaeis guineensis*) to obtain an acid-hydrolyzed hemicellulose for fermentation. The hydrolyzate was obtained using dilute sulfuric acid, which was efficient at dissolving the hemicellulose. Three methods of detoxification of inhibitors were tested, including the use of activated carbon treatment and a combination treatment employing overliming and activated carbon. Greater than 90% of the phenolic substances, furfural and 5-hydroxymethylfurfural were removed from the hydrolysis product. The NRRLY 1214 and NRRLY7124 strains of *Scheffersomyces stipitis* produced the highest yields of ethanol, 6.2 and 6.13 g L⁻¹, in the medium detoxified by the overliming procedure. These strains achieved the highest rates of Y_p / s (0.32 and 0.33) and Ef (64.46 and 64.89%) in the same medium. The data confirm that these strains have a potential for fermentation of the hemicellulose fraction of palm kernel cake. The use of the acid hydrolyzate of palm kernel cake without supplementation was shown to be unfeasible under the conditions tested, as reflected in the insignificant yields of ethanol. The data obtained will contribute positively to the use of agro-industrial waste, as well as to advances in the area of the production of second-generation ethanol.

Keywords: Bioethanol. Hemicellulose. Acid hydrolysis. *Scheffersomyces stipitis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema ilustrativo apresentando a estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal.....	31
Figura 2: Estrutura esquemática da celulose	32
Figura 3: Estrutura esquemática da hemicelulose.....	33
Figura 4: Estrutura esquemática da lignina.....	34
Figura 5: Aparência física do fruto do dendê.....	38
Figura 6: Hidrólise ácida da hemicelulose modelo 1	42
Figura 7: Hidrólise ácida da hemicelulose modelo 2.....	42
Figura 8: Mecanismo de desidratação da xilose durante a formação do furfural.....	43
Figura 9: Mecanismos de conversão de hexoses a 5-hidroximetilfurfural.....	44
Figura 10: Via metabólica da conversão da xilose e glicose a etanol.....	46
Figura 11: Representação esquemática da obtenção dos ensaios fermentativos 1 e 2.....	54
Figura 12: Perfil do crescimento celular das linhagens de <i>Scheffersomyces stipitis</i>	63
Figura 13: Perfil do consumo de AR e do crescimento celular das linhagens de <i>Scheffersomyces stipitis</i> nos meios suplementados.....	67
Figura 14: Perfil do consumo de AR e glicose das linhagens de <i>Scheffersomyces stipitis</i> nos meios suplementados.....	70
Figura 15: Perfil do consumo de AR e glicose das linhagens de <i>Scheffersomyces stipitis</i> nos meios não-suplementados.....	77
Figura 16: Perfil do crescimento celular baseado na leitura direta da densidade óptica D.O _{600 nm} das linhagens de <i>S. stipitis</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: :Biomassas utilizadas na produção de bioetanol de segunda.....	36
Tabela 2: Composição química da torta de dendê.....	48
Tabela 3: Condições experimentais para obtenção do hidrolisado hemicelulósico da torta de dendê.....	49
Tabela 4: Condições operacionais das análises dos compostos furfural, 5-hidroxi metilfurfural e ácido acético por HPLC.....	51
Tabela 5: Composição química do hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê (HAH) antes e após os processos de destoxificação e efeito destes processos na remoção dos açúcares redutores, glicose, ácido acético, compostos fenólicos, furfural e o 5-hidroxi metilfurfural (HMF).....	59
Tabela 6: Dados dos parâmetros fermentativos (etanol, $ETHO_T$; rendimento de etanol, $Y_{p/s}$ $g_{etanol}g_{açúcar}^{-1}$; eficiência fermentativa, E_f %; produtividade volumétrica, Q_p $g L^{-1} h^{-1}$; e crescimento máximo específico, μ_x h^{-1}), obtidos para as três linhagens das linhagens de leveduras de <i>S. stipitis</i> (CBS 6054, NRRLY 1214 e NRRLY 7124) frente aos hidrolisados ácidos hemicelulósicos e seus respectivos tratamentos de destoxificação.....	71
Tabela 7: Dados do desempenho das linhagens de leveduras de <i>S. stipitis</i> (CBS 6054, NRRLY 1214 e NRRLY 7124) frente aos hidrolisados ácidos hemicelulósicos suplementados submetidos a diferentes tratamentos de destoxificação. Parâmetros analíticos: concentração e rendimento de etanol, produtividade volumétrica e taxa específica de crescimento.....	72
Tabela 8: Concentração de etanol, rendimento de etanol ($Y_{p/s}$ $g_{etanol} g_{açúcar}^{-1}$), eficiência fermentativa (E_f %), produtividade volumétrica (Q_p $g L^{-1} h^{-1}$) e crescimento máximo específico (μ_x h^{-1}) das linhagens de leveduras de <i>S. stipitis</i> (CBS 6054, NRRLY 1214 e NRRLY 7124) frente aos hidrolisados ácidos hemicelulósicos não suplementados e seus respectivos tratamentos de destoxificação (HAHns, HDOns, HDCAns e HDOCAns).....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: graus Celsius

μ x: taxa específica de crescimento

2G: Segunda Geração

AcA: ácido acético

AR: açúcares redutores

C5: monossacarídeo de cinco carbonos

C6: monossacarídeo de seis carbonos

CF: compostos fenólicos

DNS: ácido dinitrosalicílico

Ef %: eficiência fermentativa em porcentagem

$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$: gramas por litros por hora

g L^{-1} : gramas por litro

$\frac{\text{g}_{\text{etanol}}}{\text{g}_{\text{açúcar}}}$: gramas de etanol por gramas de açúcar

GOD/POD: enzima glicose oxidase/peroxidase

h: horas

HAH: hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê

HAHns: hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê sem tratamento não suplementado

HAHs: hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê sem tratamento suplementado

HDCA: hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê destoxificado por carvão ativado

HDCAns: hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê destoxificado por carvão ativado não suplementado

HDCAs: hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê destoxificado por carvão ativado suplementado

HDO: hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê destoxificado por overliming

HDOCA: hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê destoxificado por overliming e carvão ativado

HDOCAns: hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê destoxificado por overliming e carvão ativado não suplementado

HDOCAs: hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê destoxificado por overliming e carvão ativado suplementado

HDOs: hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê destoxificado por overliming não suplementado

HDOs: hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê destoxificado por overliming suplementado

HMF: 5-hidroximetilfurfural

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

Lag: fase de adaptação celular

Log: fase de crescimento celular exponencial

m/v: massa por volume

min: minutos

mL: mililitros

MSI: meio sintético composto por 20 g L⁻¹ de xilose, 1,25 g L⁻¹ de ureia, 1,1 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹ de extrato de levedura e 40 mL L⁻¹ de uma solução de sais.

n^o células mL⁻¹: número de células por mililitro

ND: não detectado

nm: nanômetros

NR: não houve remoção

OPEFB: *oil palm empty fruit bunches*

PA: Pará

PPF: *palm pressed fiber*

Qp: produtividade volumétrica

rpm: rotações por minuto

tg: tempo de geração

ton ano⁻¹: toneladas por ano

v/v: volume por volume

XDH: xilitol desidrogenase

XR: xilitol redutase

YMA: meio de cultura composto por 0,3 % de extrato de levedura 0,3% de extrato de malte, 0,5 % de peptona e 1% de glicose

Yp/s: rendimento em etanol

μL: microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVO GERAL	27
2.1 Objetivos específicos	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
3.1 Etanol de 2ª geração e suas biomassas lignocelulósicas	28
3.2 Pré-tratamento e Destoxificação	36
3.3 Pré-tratamento físico.....	37
3.4 Pré-tratamento químico.....	38
3.5 Destoxificação do hidrolisado ácido hemicelulósico.....	41
3.6 Metabolismo da xilose na fermentação alcoólica	43
3.7 Processo fermentativo.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Aquisição da torta de dendê.....	46
4.2 Preparo do hidrolisado hemicelulósico.....	46
4.3 Destoxificação do hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê	49
4.4 Condições de cultivo das linhagens de <i>Scheffersomyces stipitis</i>	50
4.5 Curva de crescimento celular das linhagens de <i>Scheffersomyces stipitis</i>	50
4.6 Processo Fermentativo	50
4.7 Parâmetros cinéticos da fermentação.....	53
5. Resultados e Discussão	55
5.1 Perfil do crescimento das linhagens de <i>Scheffersomyces stipitis</i>	60
5.2 Perfil fermentativo das linhagens de <i>Scheffersomyces stipitis</i> nos HAH de torta de dendê suplementados, com e sem destoxificação	67
5.3 Perfil fermentativo das linhagens de <i>Scheffersomyces stipitis</i> nos HAH de torta de dendê não suplementados, com e sem destoxificação	61
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda de energia nos últimos anos, somado ao aquecimento global e esgotamento das fontes fósseis de energia tem se tornado um dos grandes desafios para a comunidade científica. Nesta conjuntura, a indústria do bioetanol tem se desenvolvido de forma progressiva nas últimas décadas, principalmente, por meio do uso, aplicação e incremento de novas técnicas que visam o favorecimento desse crescimento. Dentre as estratégias para o desenvolvimento do uso de energia renovável, tem-se o aproveitamento de biomassas lignocelulósicas, que nos últimos anos tem merecido atenção sendo alvo de vários estudos científicos. Algumas biomassas lignocelulósicas figuram como matérias-primas atrativas para a produção de bioetanol (TOQUERO & BOLADO, 2014; GUTIERREZ-RIVERA *et al.*, 2015), dentre estas tem-se o dende (*Elaeis guineensis*), cultura agrícola dominante em muitos países como a Malásia e Indonésia, que são os dois maiores produtores de óleo deste fruto do mundo. Gan & Li (2014) e Lam *et al.* (2009), reportaram que esta cultura tem destaque principalmente devido ao seu alto rendimento em óleo, o qual pode ser explorado na produção de biodiesel. Na América do Sul, o Brasil é o terceiro maior produtor depois da Colômbia e do Equador, produzindo 340 milhões de toneladas, o que representa 0,58% da produção de óleo de dendê em todo o mundo. O Brasil tem uma área potencial para cultivar o dendezeiro com cerca de 70 milhões de hectares, o que pode torna-lo um dos maiores produtores mundiais (MEDINA *et al.*, 2015).

Em paralelo com a produção de óleo, a massa fibrosa proveniente da separação (debulhamento) dos frutos do cacho [*oil palm empty fruit bunches* (OPEFB)] e a torta fibrosa residual produzida após o processo de extração do óleo dos frutos frescos [*palm pressed fiber* (PPF)] são coprodutos gerados que não possuem destino certo (Shinoj *et al.*, 2011). Todavia, este resíduo tem despertado interesse na produção de etanol de segunda geração devido aos consideráveis conteúdos de celulose e hemicelulose presentes na parede celular desta cultura (ZAKARIA *et al.*, 2014; ZAKARIA *et al.*, 2015, SHINOJ *et al.*, 2011)

O etanol lignocelulósico envolve algumas variáveis que contribuem de forma significativa para o desempenho do processo fermentativo. Dentre estas, temos as etapas de pré-tratamento que devido à recalcitrância do material lignocelulósico, torna-se necessária de forma a superar tal condição. As metodologias de pré-tratamento referem-

se à solubilização e/ou remoção das frações que compõe a biomassa lignocelulósica (GUPTA & VERMA, 2015). As três principais formas de pré-tratamento dessas biomassas utilizam processos biológicos, físicos ou químicos. Dentre estas, os métodos químicos que utilizam ácidos diluídos vêm sendo amplamente empregados a fim de solubilizar a fração hemicelulósica, que resulta, principalmente, em açúcares como a D-xilose, L-arabinose, D-glicose e outros (CERVERÓ *et al.*, 2010; MENON *et al.*, 2012).

A D-xilose é o açúcar mais abundante formado nos processos de hidrólise da hemicelulose (SILVA *et al.*, 2012; KUNDU *et al.*, 2015). No entanto, a *Saccharomyces cerevisiae*, levedura comumente empregada nos processos de fermentação de glicose a etanol, não possui habilidade para converter açúcares de cinco carbonos, no processo de transformação a etanol. Sendo assim, a fim de alcançar maiores rendimentos por meio da utilização destes açúcares nos processos de fermentação, faz-se necessário o uso de micro-organismos especializados, como a *Scheffersomyces stipitis* (KURTZMAN *et al.*, 2010), descrita anteriormente como *Pichia stipitis* (PIGNAL, 1967), que apresenta a capacidade de metabolizar tais açúcares. Esta levedura tem sido amplamente utilizada nos processos de fermentação provenientes de hidrolisados hemicelulósicos para a produção de álcool (AGBOGBO *et al.*, 2006; MATEO *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2012) devido a sua eficiente capacidade de metabolizar a D-xilose. Além das pentoses esta levedura é capaz de fermentar açúcares como glicose, manose, galactose e celobiose que também estão presente no processo de hidrólise (SILVA *et al.*, 2012). Porém, várias substâncias definidas como tóxicas e inibidoras do processo fermentativo são formadas durante as etapas de hidrólise ácida do material lignocelulósico (CAMESASCA *et al.*, 2015; KUNDU *et al.*, 2015) diminuindo assim, as taxas de rendimento e produtividade do processo por afetar de forma negativa o metabolismo do micro-organismo (SUN *et al.*, 2012). Dentre os principais inibidores, provenientes da etapa de hidrólise, tem-se os compostos fenólicos, formados a partir da degradação da lignina (GUPTA *et al.*, 2012); o furfural e o 5-hidroximetilfurfural produzidos a partir da desidratação das pentoses e hexoses, respectivamente (MATEO *et al.*, 2013) e ainda, o ácido acético proveniente da hidrólise ácida dos grupamentos acetila da hemicelulose (KUNDU *et al.*, 2015). Por tanto, visando reduzir os impactos desses inibidores no metabolismo microbiano e conseqüentemente aumentar as taxas de rendimento do processo faz-se necessário uma etapa adicional de destoxificação. A etapa de destoxificação se apresenta como uma estratégia de remoção total ou parcial dos compostos tóxicos formados durante o pré-tratamento que findam por minimizar os pronunciados efeitos no desempenho da

fermentação. Dentre os principais tratamentos, o carvão ativado e hidróxido de cálcio (*overliming*) têm sido utilizados nos processos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico (CHI *et al.*, 2013; MATEO *et al.*, 2013; KAMAL *et al.* 2011). Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito dos processos de destoxificação por carvão ativado, *overliming* e a combinação dos dois tratamentos no desempenho de três linhagens de *Scheffersomyces stipitis* na fermentação alcoólica de hidrolisados hemicelulósicos da torta de dendê.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito dos processos de destoxificação por carvão ativado, *overliming* e a combinação dos dois tratamentos no desempenho de três linhagens de *Scheffersomyces stipitis* na fermentação alcoólica de hidrolisados hemicelulósicos da torta de dendê.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar a eficiência dos três métodos de destoxificação (carvão ativado, *overliming* e a combinação dos dois métodos, carvão ativado e *overliming*) na remoção de compostos fenólicos, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural do hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê.

Avaliar a produção de etanol pelas três linhagens de *Scheffersomyces stipitis* frente ao hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê com e sem os processos de destoxificação.

Avaliar o efeito da diluição dos hidrolisados ácidos da torta de dendê com e sem os processos de destoxificação, a partir da adição de uma fonte nutricional, no desempenho fermentativo das três linhagens de *Scheffersomyces stipitis*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Etanol de 2ª geração e suas biomassas lignocelulósicas

O aumento da demanda de energia nos últimos anos, somado ao esgotamento das fontes fósseis de energia e ao aquecimento global tem se tornado um dos grandes desafios para a comunidade científica (TRUMBO & TONN, 2016; KOIZUMI, 2015). O planeta contém uma grande quantidade de fontes energéticas não renováveis, muitas destas esgotáveis na escala de tempo humano, pois apesar dos incentivos na produção de energia a partir de fontes renováveis, a grande maioria dos países ainda depende das fontes não renováveis (TRUMBO & TONN, 2016). Alguns cientistas têm relatado que a sociedade atingiu, ou atingirá em breve, o máximo de exploração de petróleo, e que após esse período de exploração a produção começará a declinar (HALLOCK *et al.*, 2014). Mohr *et al.* (2015) analisaram a projeção da produção de carvão, gás natural e petróleo no mundo para as próximas décadas e relataram que o declínio na produção de petróleo ocorrerá em aproximadamente 84 anos, para o carvão em 34 e para o gás natural, 44 anos. Estas circunstâncias, juntamente com protocolos políticos e fatores econômicos levaram uma mudança global de paradigma quanto aos combustíveis alternativos que ofereçam um desenvolvimento mais sustentável, que sejam renováveis e que zelem pela preservação do meio ambiente (AKHLAGHI *et al.*, 2015).

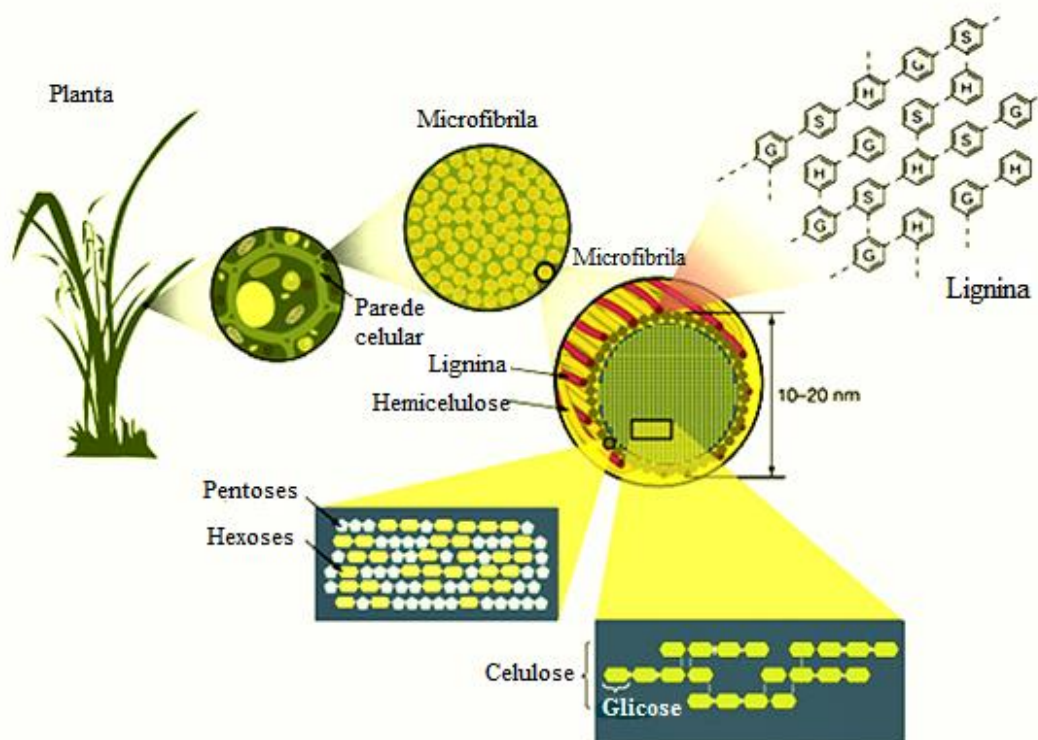
Dentre as propostas viáveis para substituição dos combustíveis fósseis, os biocombustíveis têm se mostrado potenciais, pois são obtidos da biomassa vegetal ou orgânica que apresentam baixo custo e estão disponíveis de forma abundante no planeta (SERNA *et al.*, 2016). ZIOLKOWSKA (2014) classificou os biocombustíveis em dois grupos: (I) os convencionais produzidos a partir de culturas comestíveis (etanol a partir de milho, beterraba sacarina, cana de açúcar, cereais, mandioca e outras fontes de açúcares; biodiesel a partir de óleos vegetais, por exemplo, soja, girassol e óleo de palma) e (II) os avançados que abrangem tanto o etanol celulósico produzido a partir de resíduos agrícolas, resíduos florestais, resíduos sólidos urbanos, quanto o biodiesel produzido a partir de microalgas.

Os biocombustíveis produzidos a partir de matérias-primas convencionais (grupo I) confrontam com a produção de alimento, o que gera discussão em torno do tema. Alguns cientistas argumentam a respeito da mudança do uso do solo, que são destinados para produção de energia em detrimento com a indústria de produção de alimentos e que

este fato teria um impacto sobre o preço dos alimentos, o que certamente, afetaria principalmente os países subdesenvolvidos (TOMEI & HELLIWELL, 2015; KOIZUMI, T., 2015). Por outro lado, os biocombustíveis avançados (grupo II), apresentam vantagens, por não competir diretamente com a produção de alimentos; ter alta disponibilidade na natureza, mesmo na forma de resíduos agroindustriais; ser matéria-prima para substituição das fontes fósseis de energia; contribuir para redução dos gases do efeito estufa e por ser considerada uma fonte renovável de energia (SERNA *et al.*, 2016; NEGAHDAR *et al.*, 2016; ZHUANG *et al.*, 2016).

Normalmente a produção do bioetanol 2G compreende-se em três etapas: (I) pré-tratamento para desorganizar a estrutura lignocelulósica (FIG 1), (II) hidrólise enzimática para produzir açúcares fermentescíveis e (III) a fermentação alcoólica, propriamente dita, destes açúcares a partir de micro-organismos (ZHUANG *et al.*, 2016).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal.



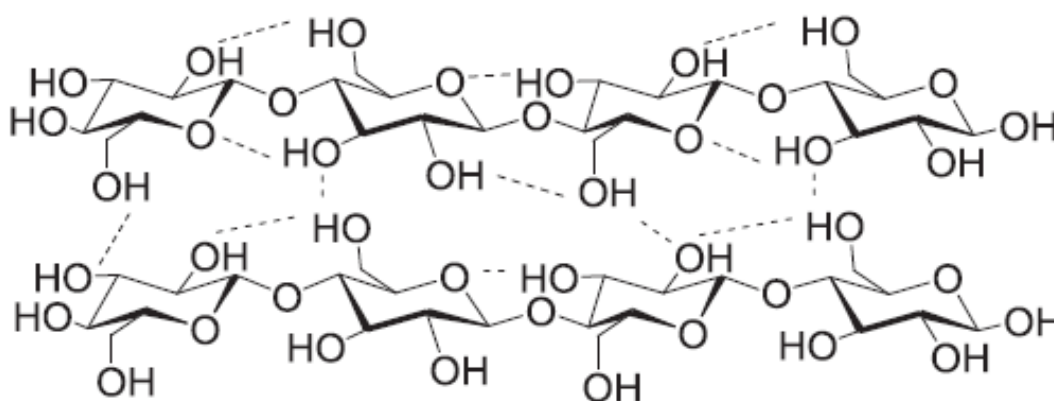
Fonte: RUBIN (2008).

Dentre as etapas da produção de etanol 2G, o pré-tratamento destaca-se por ser determinante nos eventos posteriores. O principal objetivo do pré-tratamento, como já relatado, é desorganizar a estrutura recalcitrante, tornando a biomassa mais susceptível ao ataque enzimático, e assim, otimizar o rendimento de açúcares. Entretanto, o

rendimento final destes depende não apenas das características da biomassa, mas também da sua interação com as condições de pré-tratamento e ação de diferentes enzimas utilizadas na sacarificação (TIMUNG *et al.*, 2015). A exploração das frações polissacarídicas, celulose e hemicelulose, é essencial para a produção rentável e econômica do bioetanol 2G (SCORDIA *et al.*, 2012).

A biomassa lignocelulósica é constituída por um polímero heterogêneo composto principalmente por carboidratos (celulose e hemicelulose) e lignina. Estas moléculas interagem intimamente umas com as outras na construção da parede celular das plantas, estes componentes não estão apenas misturados, mas sim, fortemente entrelaçados através de ligações covalentes e não covalentes (SUN *et al.*, 2016). A celulose, macromolécula constituída por unidades monoméricas de D-glicose ligadas entre si através de ligações glicosídicas β -1,4 (FIG 2) é o homopolissacarídeo mais abundante na natureza representando cerca de $1,5 \times 10^{12}$ toneladas da produção anual de biomassa (NAGAHDAR *et al.*, 2016). Cada unidade de repetição desta molécula contém três grupos hidroxilas os quais estão ligados em rede com unidades adjacentes através das ligações de hidrogênio. A disposição das ligações torna a estrutura da celulose cristalina e amorfa formando fibras que garante a estabilidade da molécula (SUN *et al.*, 2016).

Figura 2 - Estrutura química da celulose

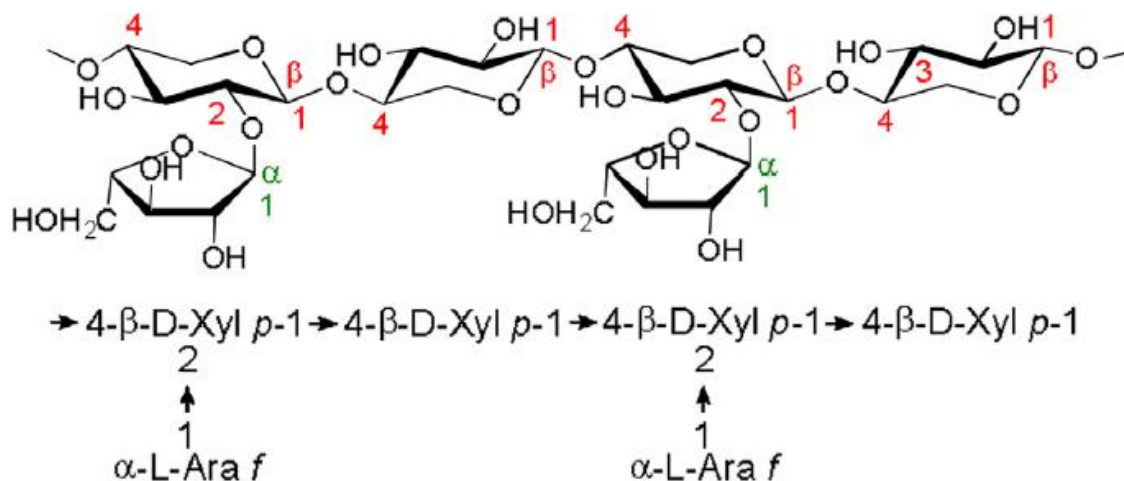


Fonte: NAGAHDAR *et al.* (2016).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo (Figura 3), muitas vezes ramificado, com baixo grau de polimerização presente em maior quantidade nas células vegetais após a celulose. Os principais monômeros que constituem a cadeia heterogênea da hemicelulose são xilose, arabinose, glicose, manose e galactose, além de ácido

glucorônico, cumárico e felúrico (JONSSÖN *et al.*, 2016). A hemicelulose se liga à celulose através das ligações de hidrogênio e na lignina, através de ligações covalentes (RAVINDRAN *et al.*, 2016).

Figura 3 - Esquema da estrutura da hemicelulose. Tipo arabinoxilana (1:1).



Fonte: NAGAHDAR *et al.* (2016).

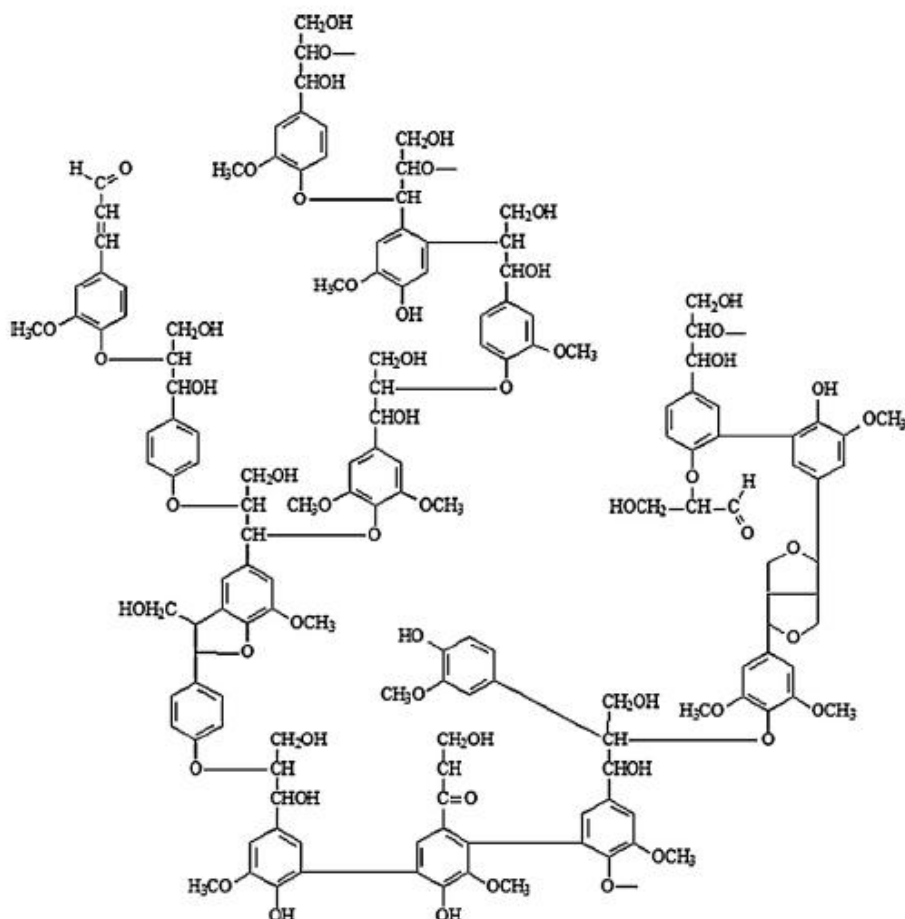
A lignina (FIG 4) é um polímero complexo de natureza aromática e amorfa tridimensional composta pelo acoplamento de álcoois monolignóis, especialmente *p*-hidroxicinamil, coniferílico e sinapílico. A estrutura distinta da lignina pode variar conforme a origem e condições de crescimento da planta (MORANDIM-GIANNETTI *et al.*, 2012). A lignina liga-se em conjunto aos componentes da parede celular resultando em uma estrutura rígida e íntegra (SUN *et al.*, 2016). Sendo assim, sua principal função é oferecer rigidez, força física, transporte de nutrientes e proteção para as plantas contra microorganismos (GORDOBIL *et al.*, 2016).

A presença elevada da hemicelulose e lignina na biomassa impede o contato das enzimas com a celulose no processo de sacarificação, o que resulta em uma baixa velocidade de hidrólise enzimática da matéria-prima. Sendo assim, a remoção destas frações pode aumentar o tamanho dos poros e a superfície acessível do material lignocelulósico, reduzir a adsorção não produtiva de enzimas à lignina, e melhorar significativamente a digestibilidade da biomassa (RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016; SERNA *et al.*, 2016).

Os resíduos de lignina provenientes da produção de etanol 2G, geralmente são incinerados na própria usina para produção de energia térmica, e assim, compensar o alto

custo da produção de etanol lignocelulósico. Entretanto, considerando a produção do bioetanol no aspecto de biorrefinaria, alguns autores têm estudado o aproveitamento da lignina na produção de substâncias com maior valor agregado, tais como cimento, pastilha de ração animal, pesticidas e outros (LI *et al.*, 2013; SANTOS, 2011).

Figura 4 - Esquema da estrutura química da lignina.



Fonte: RABEMANOLONTSOA & SAKA, (2016).

Uma grande variedade de biomassa lignocelulósica tem sido utilizada em estudos recentes na produção de bioetanol 2G (TAB 1). A diferença na composição química das biomassas reflete em diferentes estratégias na etapa de pré-tratamento para desfazer a estrutura intrínseca e recalcitrante do complexo lignocelulósico. Desta forma, conhecer a composição química da biomassa se faz essencial para condução dos processos de obtenção do bioetanol 2G. Dentre os resíduos potenciais que têm sido estudados para produção de etanol lignocelulósico destacam-se, a palha de arroz, a palha de trigo, o bagaço de cana-de-açúcar e bagaço do sorgo. Uma breve abordagem sobre estas matérias-

primas encontra-se a seguir, todavia, foi dada ênfase a torta de dendê (*Elaeis guineensis*) por ser alvo deste estudo.

A palha de arroz é o resíduo industrial mais abundante produzido em todo o mundo, cerca de 600-900 milhões de toneladas são produzidas todo ano (DEVENDRA & PANDEY, 2016). Este resíduo tem sido explorado na produção de bioetanol 2G pela sua abundância e consideráveis valores de celulose (32-47%) e hemicelulose (19-27%), entretanto, ainda existem desafios e limitações na conversão da biomassa a etanol (BIONOD *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Biomassas lignocelulósicas utilizadas na produção de bioetanol de segunda geração sob diferentes estratégias de pré-tratamentos e agentes fermentativos.

Biomassa	Pré-tratamento	Agente fermentativo	Eficiência fermentativa %	Referência
Palha de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Ultra-som e enzimático	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61	Sindhu <i>et al.</i> , 2016
Palha de trigo (<i>Triticum spp</i>)	Hidro-térmico e enzimático	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85	Ruiz <i>et al.</i> , 2012
Torta de dendê (<i>Elaeis guineensis</i>)	Térmico e enzimático	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80	Ceveró <i>et al.</i> , 2010
Bagaço de cana (<i>Saccharum officinarum</i>)	Ácido, explosão a vapor e enzimático	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91	Neves <i>et al.</i> , 2016
Bagaço de cana (<i>Saccharum officinarum</i>)	Ácido	<i>Scheffersomyces shehatae</i>	85	Dussán <i>et al.</i> , 2016
Capim-elefante (<i>Pennisetum purpureum</i>)	Ácido, alcalino e enzimático	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Scheffersomyces stipitis</i>	72 (hexoses) e 66 (pentoses)	Camesasca <i>et al.</i> , 2015
Cana-do-reino (<i>Arundo doni</i>)	Ácido	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	64	Scordia <i>et al.</i> , 2012
Resíduos da beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	Ácido	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	49	Yucel & Aksu, 2015
Resíduos da tulipeira (<i>Spathodea campanulata</i>)	Ácido	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	90	Kundu <i>et al.</i> , 2015

Fonte: O AUTOR

A palha de trigo é o segundo resíduo industrial mais abundante da agricultura mundial, gerando cerca de 350-600 milhões de toneladas de palha anualmente que são utilizados como alimento de baixo valor comercial para o gado (SINGHANIA *et al.*, 2014; RUIZ *et al.*, 2012). Considerando sua composição lignocelulósica, Sarkar *et al.*, (2012) reportaram que a partir de 35 a 45% de celulose e 20 a 30 % de hemicelulose, submetidos a hidrólise e fermentação poderiam ser produzidos cerca de 100 bilhões de litros de bioetanol 2G.

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo fibroso gerado durante a extração do caldo da cana-de-açúcar das usinas de beneficiamento de açúcar ou etanol e se constitui em uma biomassa atrativa na produção de etanol 2G. Este fato está atrelado à sua abundância e elevados teores de celulose e hemicelulose (38 e 24%) (NEVES *et al.*, 2016). Em países tropicais tais como Brasil e China, um montante de 500 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar são produzidos anualmente, todavia, metade desse montante é utilizado na produção de energia e a outra metade não possui destino (SAMBUSITI *et al.*, 2015).

O sorgo é uma cultura perene que cresce em áreas marginais que pode ser adaptada a clima temperado e tropical (KHALIL *et al.*, 2015; JAFARI *et al.*, 2016). O bagaço do sorgo sacarino tem se mostrado promissor na produção de etanol 2G devido ao seu baixo período de maturação, cerca de 3 a 5 meses, valores consideráveis de polissacarídeos (26% de celulose e 17 % de hemicelulose) (KHALIL *et al.*, 2015) e alto rendimento em biomassa. No entanto, a cada 10 toneladas de planta maceradas, cerca de 5 a 6 toneladas são resíduos úmidos sem destino.

Dentre as culturas vegetais já mencionadas e outras com potencial na área de biocombustíveis, o dendê (*Elaeis guineensis*) (FIG 5) tem se destacado devido ao seu alto rendimento em óleo com potencial para produção de biodiesel (GAN & LI, 2014; LAM *et al.*, 2009).

O dendê, ou óleo de palma, é uma *Arecaceae* de origem africana que produz frutos do tipo drupa com elevado teor de óleo altamente saturado, comumente utilizado na indústria alimentícia em países africanos, sudeste asiático e na América do Sul (VICENT *et al.*, 2014). O *ranking* dos cinco maiores produtores mundiais dos frutos do dendê incluem Indonésia, Malásia, Tailândia, Colômbia e Nigéria (MBA *et al.*, 2015).

Estima-se que a produção em óleo deverá atender a uma demanda mundial de 78 milhões de toneladas até 2020, devido aos investimentos tecnológicos e expansão agrícola que vêm sendo aplicados, tais como, melhoramento genético das culturas, seleção de

culturas com alto potencial de produção e a utilização de áreas degradadas para plantio (GAM & LI, 2014). O aumento na produção de óleo refletirá em um considerável aumento de resíduos agroindustriais do dendê, os quais possuem teores de celulose e hemicelulose significativos e passíveis de serem explorados na indústria de produção de álcool lignocelulósico (ZAKARIA *et al.*, 2015; PRADO *et al.*, 2014; CEVERÓ *et al.*, 2010).

Figura 5 - Aspecto do dendê: (A) Aparência física do fruto em corte transversal com os frutos tipo drupa e (B) cachos do dendezeiro.



Fonte: BIODIESELBR (2016).

Nas últimas décadas o Brasil tem sido o décimo maior produtor de óleo de dendê no mundo, sendo 80% de toda produção utilizada na indústria alimentícia. Todavia, o lançamento do Programa Nacional de Produção de Biodiesel (PNPB) incluiu o óleo de dendê como matéria-prima na produção de biodiesel, fato que contribui para agregar maior valor a esta cultura. Neste contexto Medina *et al.*, (2016) reportam que na região Nordeste já foram identificados 31,8 milhões de hectares de área florestal com boas condições climáticas e de solo para cultivo do dendê, e que além disso, a região já conta com a operação de 13 plantas pilotos que melhorou a produção desta cultura gerando 751 milhões de litros de óleo/ano.

Um dos coprodutos do beneficiamento do óleo de dendê, que tem sido explorado como biomassa para produção de etanol de segunda geração, são os cachos vazios do dendezeiro [*oil palm empty fruit bunches (OPEFB)*] remanescentes da colheita. Duangwang *et al.* (2016) estudaram as condições adequadas para maximizar a produção de xilose a partir da ráqui *OPEFB* em escala piloto. Os autores utilizaram a hidrólise ácida e explosão a vapor para solubilização da hemicelulose, e recuperaram $87,58 \pm 0,21$

gramas de xilose por kilograma de *OPEFB* seco. A fermentação deste hidrolisado pela levedura *Candida shehatae* TISTR 5843 resultou em um rendimento de $0,30 \pm 0,08$ gramas de etanol por gramas de xilose. Medina *et al.* (2016) também estudaram o efeito do pré- tratamento a partir da explosão a vapor na catálise desta *OPEFB* e observaram uma redução de 60,12% no teor de hemicelulose e um aumento na concentração de celulose em 34,69%. Foi observado que o tratamento aumentou a digestibilidade da celulose em 33% resultando em um hidrolisado com $4,2 \text{ g L}^{-1}$ de glicose.

Um outro coproduto do dendê é aquele oriundo da extração do óleo que se constitui do resíduo deste processo, e é denominado de torta de dendê ou fibra pressionada da palma (*palm pressed fiber*). A produção de óleo no Brasil tem sido cerca de 416.000 ton ano⁻¹, que conduz a produção de 318.000 ton ano⁻¹ de torta de dendê comumente utilizado na suplementação animal e como combustível de caldeiras que são subprodutos de baixo valor agregado (PRÁ *et al.*, 2016). Tendo em conta os valores de polissacarídeos presentes na torta de dendê, 25 a 65% de celulose e 21 a 33,5% de hemicelulose (ZAKARIA *et al.*, 2014; ZAKARIA *et al.*, 2015; SHINOJ *et al.*, 2011; SAIDU *et al.*, 2014; BOONSAWANG *et al.*, 2012), esta biomassa se apresenta como potencial para exploração do bioetanol 2G. No Brasil, a produção de etanol 2G é realizada a partir do bagaço da cana-de-açúcar, um fato a ser considerado é que as concentrações das frações de celulose e hemicelulose desta biomassa são similares da torta do dendê, mostrando assim haver um potencial que deve ser explorado. Cabe ressaltar que os estudos envolvendo o pré-tratamento da torta de dendê para produção de etanol lignocelulósico ainda são incipientes necessitando de maiores abordagens.

3.2 Pré-tratamento e Destoxificação

A etapa de pré-tratamento tem como propósito tornar mais acessível a reação das enzimas hidrolíticas com a fração celulósica da biomassa (GUPTA *et al.*, 2015). Desta forma, o pré-tratamento reduz a recalcitrância do material lignocelulósico de tal forma a superar as características intrínsecas da biomassa. O aumento da porosidade da estrutura lignocelulósica para o ataque enzimático é essencial para a viabilidade econômica do processo (CHEN *et al.*, 2016).

As três principais formas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica são aquelas utilizando processos **biológicos**, **físicos** ou **químicos**. No processo de pré-tratamento biológico são utilizados microrganismos capazes de degradar o complexo

lignocelulósico. Uma grande variedade de bactérias e fungos é utilizada na degradação da celulose e hemicelulose em seus monômeros de açúcares, dentre esses destaca-se o gênero de bactérias *Clostridium sp.* Estas bactérias possuem um complexo sistema enzimático extracelular denominado celulosoma o qual possui enzimas associadas, tais como a endo e exoglucanases, hemicelulases e pectinases (RABEMANOLONTSOA *et al.*, 2016). Os principais fatores avaliados para um melhor processo de sacarificação biológica da biomassa são temperatura, pH, tamanho da partícula da biomassa, acessibilidade do substrato e pressão parcial de hidrogênio. Os monossacarídeos resultantes da hidrólise são compostos intermediários no metabolismo dos microorganismos, desta forma torna-se difícil interromper o metabolismo ao nível deste substrato (DIONISI *et al.*, 2014).

3.3 Pré-tratamento físico

Os tratamentos físicos possuem o objetivo de diminuir as partículas da biomassa e assim aumentar a superfície de contato para o ataque enzimático e digestibilidade da celulose. As tecnologias de tratamentos físicos incluem algumas metodologias tais como a explosão a vapor, tratamento hidrotérmico e radiação de alta energia (ZHENG *et al.*, 2009).

O tratamento por explosão a vapor ocorre sob alta temperatura e pressão durante segundos até alguns minutos. O vapor de água saturado penetra na biomassa e expande as paredes celulares das fibras. Em seguida, a pressão é reduzida rapidamente até o nível da pressão atmosférica (RABEMANOLONTSOA *et al.*, 2016).

O tratamento líquido com água quente é conduzido em temperaturas próximas a 200°C e pressão elevada. A água sob alta pressão penetra na biomassa e remove grande parte da hemicelulose e uma pequena parte da lignina, a solubilização da hemicelulose é catalisada por íons de hidrogênio produzidos pela auto-ionização da água (JONSSÖN *et al.*, 2016).

O modo de ação da radiação de alta energia está atrelado às alterações das características da biomassa celulósica, incluindo aumento da área de superfície, diminuição do grau de polimerização e de cristalinidade da celulose, hidrólise da hemicelulose, e despolimerização parcial da lignina. Os métodos de radiação de alta energia incluem a utilização de raios gama, ultra-som, feixe de elétrons e ultravioleta (UV) (ZHENG *et al.*, 2009).

3.4 Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico utiliza substâncias químicas como catalisadores na reação de hidrólise da biomassa lignocelulósica. O pré-tratamento envolve a utilização de ácidos, bases, solventes orgânicos (*Organosolv*) dentre outros.

O pré-tratamento alcalino tem sido utilizado na deslignificação da biomassa, o que permite melhor acessibilidade e posterior hidrólise da celulose através das enzimas. Os principais reagentes alcalinos são hidróxido (NaOH) de sódio, hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de amônio (NH₄OH) e hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] (RABEMANOLONTSOA *et al.*, 2016).

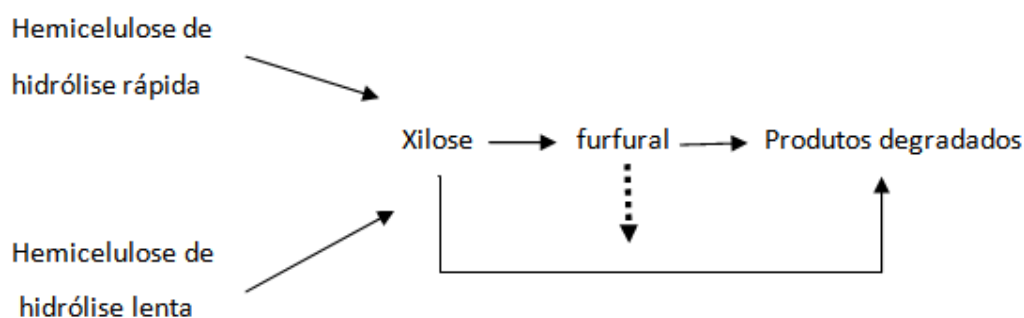
A metodologia *Organosolv* é utilizada na deslignificação e solubilização simultânea da hemicelulose. Neste processo, um solvente orgânico é utilizado na presença ou não de um catalisador ácido ou básico, normalmente, a presença do catalisador aumenta a solubilização da lignina e celulose (ZHENG *et al.*, 2009).

A utilização de ácido diluído tem sido explorada na solubilização da hemicelulose, neste caso, os ácidos são utilizados como catalisadores no processo de solubilização. Dentre eles o ácido sulfúrico, clorídrico, fosfórico, fluorídrico e nítrico (RABEMANOLONTSOA *et al.*, 2016). A hemicelulose solubilizada pode ser recuperada na forma de seus monossacarídeos presentes no hidrolisado ácido, a fração sólida resultante da hidrólise apresenta celulose e lignina isoladas. Os principais açúcares resultantes da hidrólise ácida da hemicelulose são xilose (açúcar majoritário), arabinose, glicose, galactose e manose (MENON *et al.*, 2012; KUHAD *et al.*, 2011).

Recentemente, Negahdar *et al.* (2016) abordaram uma revisão de modelos básicos para a hidrólise ácida da celulose e hemicelulose, sendo eles: (I) modelo cinético tradicional e (II) modelo cinético considerando oligossacarídeos como intermediários.

A hidrólise da hemicelulose pelo modelo I foi descrito por Kobayashi & Sakai (1955) através da proposta de hidrólise da xilana em uma cinética bifásica: xilana de reação rápida e xilana de reação lenta. Este modelo foi baseado no fato de que a taxa de reação de hidrólise diminui significativamente após 70% de conversão. Dessa forma, a modelagem cinética da hidrólise da hemicelulose foi baseada no seguinte esquema de reação (FIG 6). Este modelo avalia a hidrólise da xilana em xilose, seguida da desidratação da xilose em furfural e a degradação do furfural em outros compostos (produto degradado).

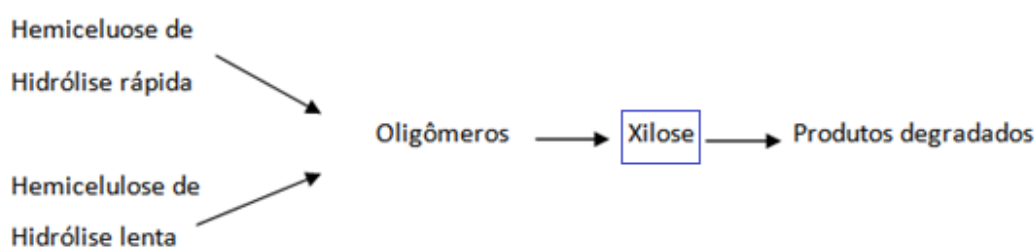
Figura 6 - Esquema do processo de hidrólise ácida da hemicelulose baseada na proposta da hidrólise da xilana em cinética bifásica.



Fonte: NEGAHDAR *et al.* (2016).

O modelo II descrito por Abatzoglou *et al.* (1992), assume que os oligômeros não são quebrados instantaneamente em sua forma monomérica e considera a presença de intermediários oligoméricos de forma abundante durante a hidrólise da hemicelulose. Moléculas de galactoglucomanas e arabinogalactonas já foram identificadas como intermediários da hidrólise ácida da hemicelulose (NEGAHDAR *et al.*, 2016). Sendo assim, uma nova modelagem foi proposta considerando a presença de intermediários (FIG 7).

Figura 7 - Hidrólise ácida da hemicelulose baseado na presença de intermediários oligoméricos.



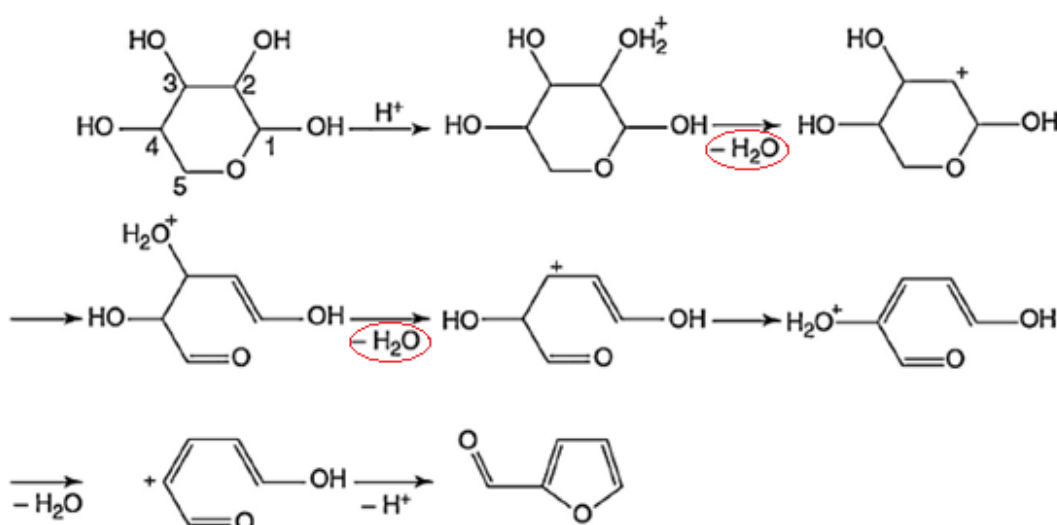
Fonte: NEGAHDAR *et al.* (2016).

No processo de hidrólise ácida da hemicelulose, além dos monômeros liberados, várias substâncias definidas como tóxicas e inibidoras do processo fermentativo são produzidas durante a etapa de hidrólise ácida do material lignocelulósico (KUNDU *et al.*, 2015; CAMESASCA *et al.*, 2015), diminuindo assim, as taxas de rendimento e

produtividade do processo (SUN *et al.*, 2011). Dentre os principais inibidores, têm-se os compostos fenólicos formados a partir da lignina (GUPTA *et al.*, 2012), o furfural a partir das pentoses e o 5-hidroximetilfurfural a partir das hexoses (MATEO *et al.*, 2013) e ainda, proveniente da hidrólise ácida dos grupamentos acetila da hemicelulose, o ácido acético (KUNDU & LEE, 2015).

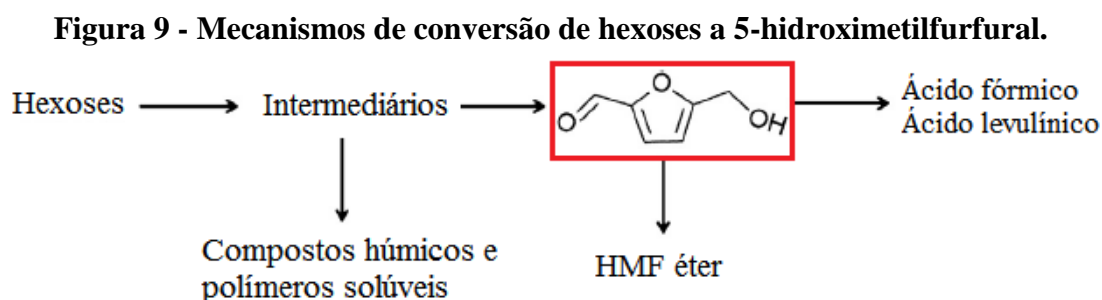
De acordo com Agirrezabal-Telleria & Gandarias (2014), o mecanismo de desidratação da xilose a furfural (FIG 8) consiste na eliminação de duas moléculas de água a partir das hidroxilas presentes nas posições 2 e 4 da molécula de xilose. Um H^+ ataca o par de elétrons do oxigênio da hidroxila e cria um átomo trivalente de oxigênio carregado positivamente. O oxigênio é mais eletronegativo que o carbono, de modo que a carga positiva desloca imediatamente o carbono vizinho para produzir uma quebra da ligação C-O, um carbono carregado positivamente e a liberação de uma molécula de água. Sob esta situação, dois elétrons são atraídos para formação de uma dupla ligação C=C. Nesta etapa, o anel é aberto e o hidrogênio busca por outro par de elétrons não ligado. Assim como anteriormente, o H^+ ataca um novo par de elétrons do oxigênio liberando mais uma molécula de água e criando uma nova dupla ligação de carbono. Nesta última desidratação, o átomo não cria outra ligação carbono-carbono, mas fecha o anel na posição 1,4 devido ao fato que os átomos que participam de ligações duplas formam estruturas planares caracterizada por ângulos de ligação de 120° (orbitais planos trigonais) o que leva a formação de furfural.

Figura 8 - Mecanismo de desidratação da xilose durante a formação do furfural



Fonte: NEGAHDAR *et al.* (2016).

Agirrezabal-Telleria *et al.* (2014), reportam ainda, que o mecanismo de conversão de carboidratos de 6 carbonos a 5-hidroximetilfurfural é uma tripla desidratação da hexose que ocorre em um processo semelhante ao que acontece com as pentoses na produção de furfural. A reação de hexoses com o ácido também pode gerar intermediários os quais podem diminuir a produção de 5-hidroximetilfurfural (FIG 9).



Fonte: AGIRREZABAL-TELLERIA *et al.* (2014).

3.5 Destoxificação do hidrolisado ácido hemicelulósico

O processo de destoxificação do hidrolisado ácido hemicelulósico tem por objetivo à eliminação ou diminuição da concentração dos inibidores fermentativos no hidrolisado. Esta é uma etapa adicional anterior ao processo fermentativo e é necessária para garantir o crescimento microbiano, bem como o desempenho de suas atividades metabólicas. O tratamento de destoxificação pode ser utilizado de forma individual ou combinado através de processos químicos, físicos ou biológicos (KUNDU *et al.*, 2015).

Na literatura, tratamentos como troca iônica, membranas de separação, métodos enzimáticos, eletrodialise, carvão ativado e hidróxido de cálcio (*overliming*) têm sido utilizados como estratégias nos processos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico (KUNDU *et al.*, 2015; MATEO *et al.*, 2013; CHI *et al.*, 2013; KAMAL *et al.*, 2011). A seguir encontram-se relatos de autores evidenciando os efeitos de alguns tratamentos no processo de destoxificação.

Brás *et al.* (2014) estudaram o aumento potencial do poder fermentativo do hidrolisado do resíduo de oliveira (*Olea europaea*) utilizando membranas de nanofiltração e observaram uma redução de 99,7% na concentração de ácido acético, 100% de furanos, bem como uma significativa melhora na fermentação do hidrolisado tratado quando comparados ao hidrolisado não tratado.

Lee *et al.* (2014) estudaram a remoção de inibidores fermentativos, na forma de ácidos orgânicos fracos, do hidrolisado ácido hemicelulósico dos resíduos de cogumelo utilizando um processo de eletrodialise. Os autores observaram remoção de 40% do ácido acético e uma total remoção do ácido oxálico do hidrolisado.

Klasson *et al.* (2013) avaliaram a destoxificação, sacarificação e fermentação simultânea do hidrolisado ácido dos resíduos industriais de “shives” (depuração da massa não branqueada da indústria de papel celulose). Os autores demonstraram que a maioria dos furanos pode ser removida em menos de 2h utilizando adsorção por carvão ativado, e ainda, que pode haver uma redução da fase de latência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e consequente melhora no processo fermentativo.

Nasidi *et al.* (2015) estudaram a melhoria na produção de etanol a partir de diferentes cultivares de sorgo, e após a etapa de hidrólise ácida da hemicelulose obtiveram a sua destoxificação por meio da combinação dos métodos de *overliming* e carvão ativado. A remoção dos inibidores deste hidrolisado aumentou a produtividade de álcool em 25% em relação ao hidrolisado não destoxificado.

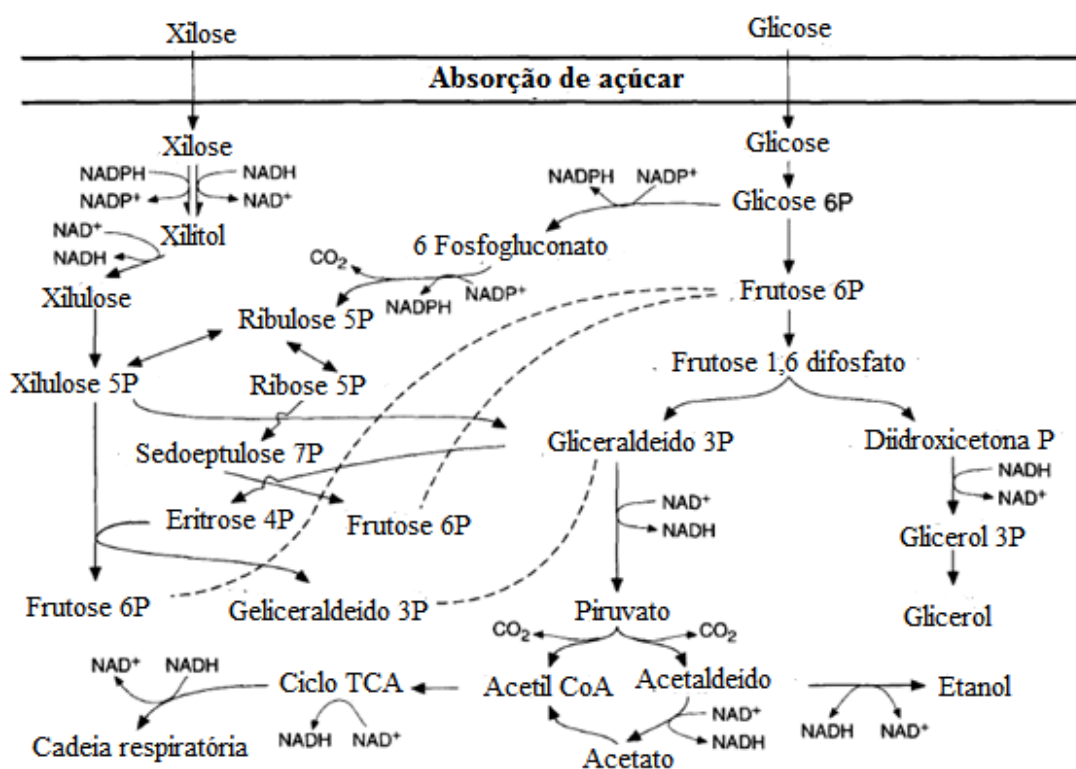
Shah *et al.* (2016) escreveram que o carvão ativado é largamente utilizado devido a sua alta porosidade, elevada área superficial específica e complexo superficiais interligado contendo oxigênio. Rocha *et al.*, (2006) relataram que estas características garantem alta adsorção dos inibidores, devido à ocorrência significativa de grupos funcionais presentes nos poros do carvão ativado com alta afinidade para com os inibidores.

Em se tratando da destoxificação por *overliming* vários autores relatam que esse processo vem sendo amplamente utilizado em virtude do baixo custo e eficiência na remoção de compostos tóxicos em hidrolisados ácidos hemicelulósicos em uma etapa anterior ao processo fermentativo (YUCEL & ASKU, 2015; MATEO *et al.*, 2013; MILLATI *et al.*, 2002). Esse processo ocorre em função da elevação do pH a partir da adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no hidrolisado ácido hemicelulósico, e consequentemente, promove a neutralização de compostos ácido acético, os quais são precipitados na forma de sal, bem como a adsorção de furfural, 5-hidroximetilfurfural e compostos fenólicos (ANDARY *et al.*, 2012).

3.6 Metabolismo da xilose na fermentação alcoólica

Hahn-Hägerdal *et al.*, (1994) descreveram a via metabólica da xilose (FIG 10) a qual ocorre através de reações de oxi-redução levando à produção de álcool em várias etapas como descrito a seguir: A primeira reação da via ocorre na transformação da xilose em xilitol, uma reação catalisada pela enzima xilose redutase (XR), na presença de NADH e/ou NADPH. Esta etapa é seguida pela oxidação do xilitol a xilulose catalisada pela coenzima NAD⁺ ligada à xilitol desidrogenase (XDH). A xilulose pode então ser fosforilada a xilulose 5-fosfato, a qual pode ser convertida, através de reações não oxidativas da via hexose monofosfato, a intermediários da via glicolítica (gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato). Esses intermediários podem então ser metabolizados por esta via, a qual está conectada a outras como o ciclo de Krebs e as de fermentação alcoólica. Li *et al.* (2016) reportam que a fermentação alcoólica da xilose conduzida em anaerobiose através da via XR/RDH produz um excedente de NADH a qual resulta na produção de xilitol e glicerol. Desta forma, um acceptor final de elétrons (O₂) se faz necessário de tal forma a reoxidar o NADH e assim inibir a produção de xilitol e facilitar o processo fermentativo.

Figura 10 - Via metabólica da conversão da xilose e glicose a etanol.



Fonte: HAHN-HÄGERDAL *et al.*, (1994)

3.7 Processo fermentativo

A fermentação alcoólica é um conjunto de reações enzimáticas, que ocorrem no interior da célula microbiana, com o intuito de gerar energia para o crescimento e manutenção das atividades metabólicas. A conversão de hexoses e pentoses em etanol são vias metabólicas distintas (FIG 10) e podem ser representadas de forma simplificada de acordo com as Equações 1 e 2 abaixo, respectivamente:



A fermentação de hexoses (C6) é um processo estabelecido e o agente fermentativo mais utilizado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura está adaptada para fermentação devido a sua alta tolerância ao etanol, crescimento em pH baixos e boa receptividade para modificações genéticas (BAEYENS *et al.*, 2015), no entanto, não possui habilidade para fermentar pentoses (C5). Nesse contexto, a levedura *Scheffersomyces stipitis* tem se destacado pela sua habilidade em fermentar açúcares C5, em especial nos hidrolisados hemicelulósicos resultantes da cadeia de produção de álcool lignocelulósico (AGBOGBO *et al.*, 2006; MATEO *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2012). A *S. stipitis*, anteriormente descrita como *Pichia stipitis* (PIGNAL, 1967), recebeu nova denominação com base nos estudos de Kurtzman & Suzuki (2010). Estes autores por meio de estudos moleculares da coenzima Q-9 descreveram novos gêneros para diversas espécies do filo ascomycetos. A espécie *Scheffersomyces stipitis* é um fungo unicelular que forma ascos com um ou dois ascósporos na forma de chapéu os quais são liberados após a formação. A reprodução é assexuada por brotamento multilateral sobre uma base estreita e as células em brotamento podem ser esféricas ou alongadas, com formação de pseudo-hifas e ausência de hifas verdadeiras. A levedura possui habilidade de fermentar glicose, bem como outros monômeros de açúcares, incluindo a xilose, importante na produção de biocombustíveis.

A levedura *S. stipitis* tem sido estudada na fermentação de hidrolisados hemicelulósicos de diferentes biomassas sob o efeito dos métodos de destoxificação, e, tem demonstrado boa desenvoltura na fermentação de hidrolisados do bagaço da cana-de-açúcar, resíduos agroindustriais da beterraba, palha de arroz e bagaço de milho (DUSSÁN *et al.*, 2016; YUCEL *et al.*, 2015; CAMESASCA *et al.*, 2015; HUANG *et al.*,

2009; GUPTA *et al.*, 2012). A utilização da *S. stipitis* na produção de etanol 2G surge como proposta para: aproveitar de forma integral os açúcares resultantes do pré-tratamento durante a fermentação, aumentar o rendimento final de etanol, e assim tornar economicamente viável a tecnologia de produção do etanol lignocelulósico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aquisição da torta de dendê

A torta de dendê (*Elaeis guineensis*) foi cedida pela empresa AGROPALMA localizada na cidade de Belém (PA) - Brasil, proveniente do processamento do dendê para extração do óleo (prensagem mecânica). Para este estudo, a torta de dendê foi cominuída em moinho de facas a fim de aumentar a superfície de contato e facilitar os posteriores procedimentos analíticos.

Neste estudo, a torta de dendê utilizada como matéria-prima não foi submetida a caracterização química, todavia, para fins de conhecimento sobre esta matéria-prima foram utilizados como parâmetros os dados obtidos anteriormente por Ferreira (2013) em seus estudos relacionados a avaliação da torta de dendê para produção de bioetanol de segunda geração. A referida autora caracterizou a torta de dendê quimicamente quanto ao teor de umidade, lipídeos, cinzas, fibra bruta, proteína bruta, açúcares solúveis totais, amido, celulose, hemicelulose e lignina, conforme descrito a seguir (TAB 2).

Tabela 2 - Composição química da torta de dendê.

Frações (%)	Torta de dendê
Umidade	5,14 ± 0,07
Lipídeos	2,72 ± 0,08
Cinzas	4,68 ± 0,57
Fibra Bruta	24,29 ± 0,24
Proteína Bruta	5,44 ± 0,29
AST	4,56 ± 0,11
Amido	5,02 ± 0,35
Celulose	25,83 ± 0,30
Hemicelulose	19,73 ± 0,98
Lignina	30,17 ± 1,62

Fonte: FERREIRA (2013).

4.2 Preparo do hidrolisado hemicelulósico

O preparo do hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê foi realizado seguindo adotando as condições ótimas do processo de pré-tratamento descritas por Ferreira (2013) (TAB3). O hidrolisado foi preparado ampliando a escala experimental em 100 vezes a fim de obter maior quantidade de hidrolisado disponível para o presente estudo.

Tabela 3: Condições experimentais utilizadas na ampliação da escala experimental para obtenção dos hidrolisados hemicelulósicos da torta de dendê.

Fator	Valores críticos
Concentração de H ₂ SO ₄ (% m/v)	5,3
Concentração de torta (% m/m)	29,0
Tempo (minutos)	61,5

Fonte: FERREIRA (2013).

Para a realização desse processo, a torta de dendê foi adicionada em frascos tipo Erlenmeyer de 1L e tratada com ácido sulfúrico 5,33% (v/v) a uma razão sólido-líquido de 29,056%. Em seguida, esse material, foi submetido a hidrólise em autoclave vertical a 121 °C, por 61,5 minutos. Posteriormente, o material foi filtrado em bomba de vácuo em papel de filtro (Grau 292, 100 x 150mm Sartorius®) previamente pesado. O filtrado foi reservado e o material sólido contido no papel de filtro foi novamente submetido a filtração, com sucessivas lavagens de água destilada até a neutralidade do pH. A seguir, o material foi submetido a secagem em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C, durante 24 horas, e, então, analisado quanto ao peso.

O filtrado reservado (líquido proveniente da primeira filtração), denominado hidrolisado ácido, foi neutralizado com uma solução 2M de hidróxido de sódio e caracterizado quanto aos teores de açúcares redutores, glicose, compostos fenólicos totais, furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido acético de acordo com as metodologias descritas a seguir.

Os açúcares redutores (AR) foram quantificados de acordo com o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, conforme Miller (1959). O teor de AR foi determinado pela adição de 100 µL do hidrolisado (centrifugado e devidamente diluído em água destilada) em micro tubos tipo Eppendorf® de 2 mL, seguido da adição de 100 µL do reagente de DNS, e após homogeneização, incubados em banho de água fervente por um período de 5 minutos. A seguir, foram adicionados 1,0 mL de água destilada, e após homogeneização procedeu-se a leitura da intensidade de cor formada pelo método colorimétrico em espectro fotômetro a 540nm. Uma curva analítica, utilizando glicose a 1g L⁻¹ como padrão, foi preparada a fim de se obter a regressão linear para o cálculo da concentração de açúcares redutores presentes nas amostras. Os teores de açúcares redutores foram expressos em g L⁻¹.

O teor de glicose foi realizado seguindo o procedimento padrão enzimático Glicose - oxidase/peroxidase - GOD/POD (LLOYDE & WHELAN, 1969). A quantificação pelo método enzimático GOD/POD por meio do Kit enzimático GLICOSE Liquiforme, LABTEST® empregando glicose a 1g L⁻¹ como padrão. Alíquotas de 10 µL do hidrolisado para uma concentração máxima de 5,0 g L⁻¹ (limite de linearidade do teste) foram adicionadas a micro tubos tipo Eppendorf® de 1,5 mL, seguido da adição de 1,0 mL da solução enzimática. O padrão foi preparado a partir da adição de 10 µL da solução de glicose a 1g L⁻¹ em micro tubos tipo Eppendorf® de 1,5 mL, seguido da adição de 1,0 mL da solução enzimática. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C, por 10 minutos. Em seguida, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 505 nm. O espectrofotômetro foi previamente calibrado com um branco constituído apenas pela solução enzimática. Os resultados do teor de glicose foram calculados de acordo com a Equação 3 e expressos em g L⁻¹ de glicose.

$$\text{Glicose (g/L)} = \left(\frac{\text{absorbância da amostra diluída}}{\text{absorbância do padrão}} \times 100 \right) \div 1000 \dots\dots\dots(3)$$

A determinação do teor de compostos fenólicos totais presentes na amostra foi conduzida conforme o método descrito por Singleton e Rossi (1965). Em micro tubo tipo Eppendorf® de 2 mL foram adicionados 100 µL de hidrolisado (centrifugado e devidamente diluído em solução de metanol 80%) e 100 µL do reagente de Folin Ciocateau 1N, seguidos de homogeneização e repouso por 5 minutos. Posteriormente a este intervalo foram adicionados 1000 µL de uma solução de carbonato de sódio 1M, e após 6 minutos, 800 µL de água destilada. A mistura foi, então, homogeneizada e mantida em ambiente escuro por 90 minutos. O teor dos compostos fenólicos totais nas amostras foi determinado pelo método colorimétrico através da leitura em espectrofotômetro a 750 nm. O teor de compostos fenólicos da amostra foi calculado a partir da regressão linear de uma curva analítica utilizando ácido gálico como padrão nas concentrações de 0 a 0,10 g L⁻¹. Os resultados foram expressos em g L⁻¹ de compostos fenólicos.

As concentrações de ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural foram determinados através de cromatografia sobre sistema Shimadzu Prominence FPLC 20A, equipado com uma coluna Rezex ROA-Shodex® (300 x 7.8 mm). O volume injetado foi de 5 µL. Os analitos foram eluídos com H₂SO₄ a 2,5 mM, com uma vazão de 0,6 mL min⁻¹ e a uma temperatura de forno de 60 ° C. Os compostos foram detectados a 210 nm

(ácido acético) e 254 nm (furanos). Foram utilizados padrões externos para identificação e quantificação dos analitos.

4.3 Destoxificação do hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê

O hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê (HAH) produzido foi dividido em partes iguais a fim de submetê-lo aos diferentes tratamentos de destoxificação, sendo:

- a) Sem tratamento de destoxificação (HAH);
- b) Destoxificação por *overliming* (HDO);
- c) Destoxificação por carvão ativado (HDCA);
- d) Destoxificação por combinação dos tratamentos b e c (HDOCA)

O hidrolisado ácido sem tratamento de destoxificação foi utilizado como parâmetro da eficiência dos demais processos de destoxificação.

A destoxificação por *overliming* foi realizada de acordo com Purwadi *et al.* (2004). Neste processo, o HAH foi tratado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (hidróxido de cálcio) até elevação do pH a 10. Em seguida, foi incubado em banho-maria a 60 °C sob agitação intermitente durante 30 minutos com posterior adição de ácido sulfúrico até a neutralidade do pH. O hidrolisado foi separado por centrifugação a 5000 rpm e o sobrenadante reservado para posterior etapa de fermentação.

A destoxificação com carvão ativado (HDCA) foi realizada segundo Mateo *et al.* (2013) pela adição de 5% (m/v) de carvão ativado ao HAH. A mistura foi mantida sob agitação vigorosa, em agitador magnético, por 30 min a 50°C, seguido de filtração a vácuo. O líquido obtido do processo de filtração foi reservado para posterior etapa de fermentação.

A destoxificação por combinação dos dois processos descritos anteriormente (HDOCA) foi realizada submetendo o HAH primeiramente ao método de *overliming*, seguido do método de destoxificação com carvão ativado, conforme a metodologia descrita anteriormente.

Os hidrolisados destoxificados, assim como, o hidrolisado bruto (sem destoxificação) foram caracterizados quanto aos teores de açúcares redutores, glicose, compostos fenólicos totais, furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido acético conforme os métodos descritos anteriormente.

4.4 Condições de cultivo das linhagens de *Scheffersomyces stipitis*

As linhagens de *S. stipitis* NRRLY 1214, NRRLY 7124 e CBS 6054 conservadas em meio líquido YMA (0,3 % de extrato de levedura 0,3% de extrato de malte, 0,5 % de peptona e 1% de glicose) e adicionada de glicerol 10% mantidas sob congelamento (-18 °C) foram reativadas. A reativação foi realizada a partir do inóculo feito com alça de platina calibrada 10 µL da cultura no meio de conservação, YMA, seguida de incubação a 28°C por 48h sob agitação a 128 rpm. Após este período, procedeu-se novo inóculo por plaqueamento em estria no meio ágar YMA seguido de incubação a 28°C por 48 horas.

4.5 Curva de crescimento celular das linhagens de *Scheffersomyces stipitis*

A fim de se conhecer o perfil de crescimento as linhagens estudadas foram monitoradas quanto ao seu crescimento por meio de uma curva de crescimento celular.

A curva de crescimento foi realizada através da contagem direta de células em câmara de Neubauer (ALVES & MORAES, 1998) a cada 2 horas até expressivo decaimento do número de células. As linhagens foram cultivadas em 50 mL do meio sintético (MSI) descrito por PEREIRA Jr., (1991) (20 g L⁻¹ de xilose, 1,25 g L⁻¹ de ureia, 1,1 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹ de extrato de levedura e 40 mL L⁻¹ de uma solução de sais [12,5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 1,25 g L⁻¹ CaCl₂.2H₂O, 12,5 g L⁻¹ de ácido cítrico, 0,9 g L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 0,19 g L⁻¹ de MnSO₄, 0,30 g L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O, 0,025 g L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O, 0,025 g L⁻¹ de CoCl₂.6H₂O, 0,035 g L⁻¹ de NaMoO₄.2H₂O, 0,050 g L⁻¹ de H₃BO₃, 0,009 g L⁻¹ de KI e 0,0125 g L⁻¹ de Al₂(SO₄)₃]. As amostras foram incubadas a 30°C sob agitação a 128 rpm. A partir dos dados obtidos foram plotados gráficos mostrando o perfil de crescimento celular com resultados expressos em n^o células mL⁻¹ em função do tempo de crescimento. Após a conclusão desta etapa foram realizados os ensaios fermentativos conforme descrito a seguir.

4.6 Processo Fermentativo

Os processos fermentativos foram conduzidos utilizando hidrolisado ácido hemicelulósico como meio de fermentação. Todavia, estes meios (HAH) foram utilizados, com e sem destoxificação, e ainda sem e com diluição em meio suplementado conforme descrito a seguir.

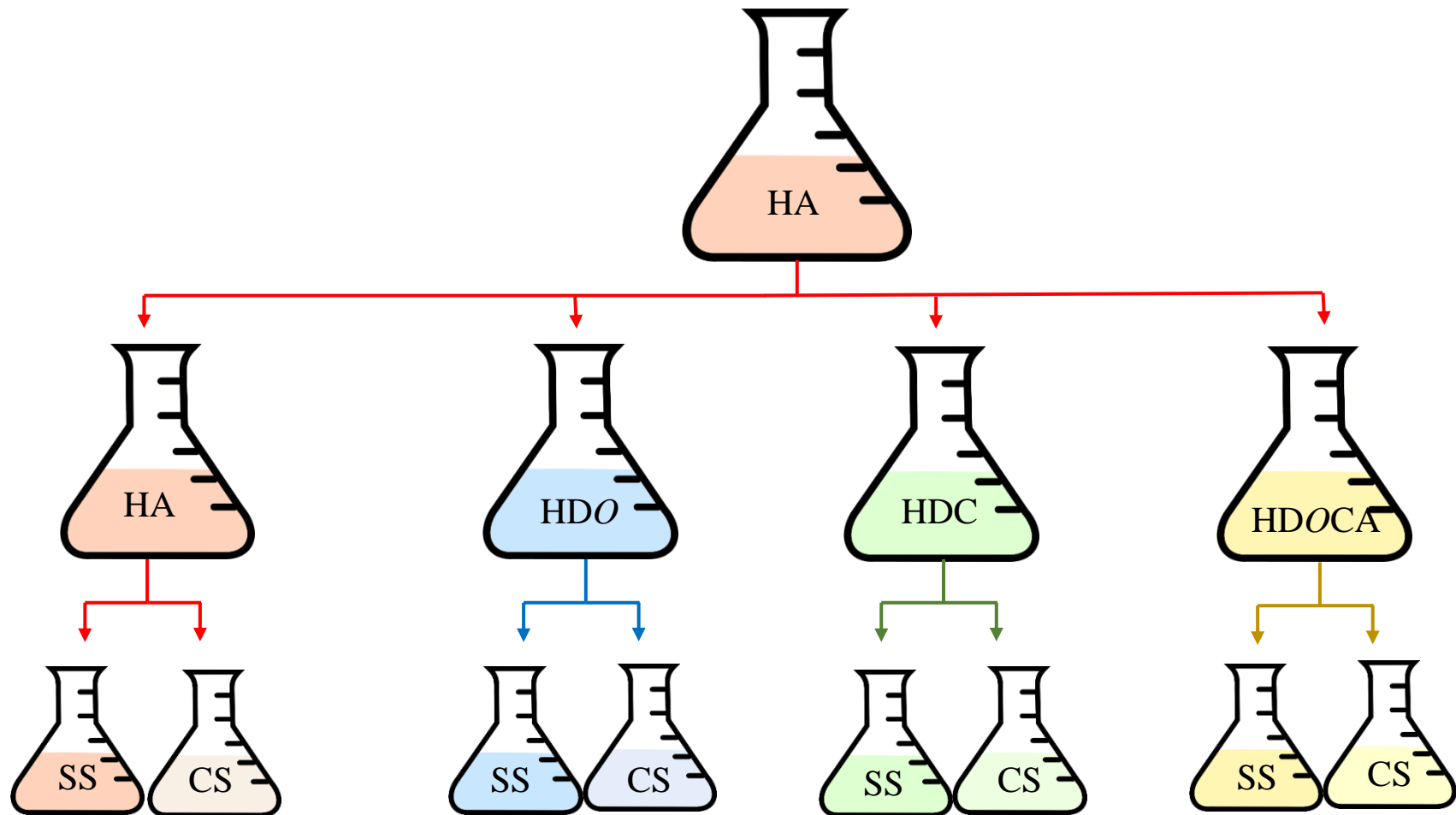
Em função da diluição dos hidrolisados em meio suplementado para o processo fermentativo, este foi conduzido em duas etapas: a primeira etapa foi realizada sem diluição em meio suplementado (HAHns), e a segunda foi realizada com diluição dos hidrolisados em meio suplementado (HAHs) conforme ilustrado no esquema apresentado na Figura 11.

A suplementação do meio de fermentação foi feita pela adição de 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 0,47 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 12,8 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,51g L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 0,47 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O conforme proposto por Bellido *et al.* (2011), entretanto sem as fontes de carbono. O meio HAH com e sem destoxificação quando suplementado foi preparado na proporção de 1:1 (meio:HAH:suplemento).

Os processos fermentativos foram conduzidos em batelada simples, em frascos cônicos de 125 mL, nas condições apresentadas (FIG11) utilizando as linhagens de *S. stipitis* (NRRLY1214; NRRLY 7124 e CBS 6054) como agente fermentativo. Para obtenção do inóculo as culturas foram previamente crescidas em meio líquido MSI, com incubação a 30°C sob agitação a 128 rpm por um período suficiente para atingir 1 nm de densidade óptica, com leitura a 600nm. Após crescimento o meio foi centrifugado a 4000 rpm e o sobrenadante descartado, o precipitado foi resuspendido com 10 mL de água destilada. Em seguida foi realizado o inóculo na concentração de 10% v/v do meio de fermentação utilizado.

Na fermentação 1 o bioprocesso foi monitorado a cada 24 horas, quanto ao crescimento celular por contagem em câmara de Neubauer (ALVES & MORAES, 1998); açúcares redutores (MILLER, 1959) e glicose, realizada pelo método enzimático GOD/POD por meio do Kit enzimático GLICOSE PAPLiquiforme, LABTEST®, conforme descrito anteriormente, e etanol, realizado ao final do processo fermentativo seguindo a metodologia descrita por Isarankura-Na-Ayudhya *et al.* (2007). Para determinação da concentração do teor de etanol as amostras foram submetidas a destilação em microdestilador de álcool (TEC132/TECNAL). A partir do destilado foi retirado uma alíquota de 150uL e transferidos para um micro tubo tipo Eppendorf de 2 mL, seguidos da adição de 1,5 mL do reagente dicromato de potássio (0, 1M) em ácido sulfúrico (5M) e, homogeneização. A reação foi deixada em repouso por 15 minutos e a concentração do teor alcoólico determinada por espectrofotometria a 590 nm. Os resultados foram calculados a partir da regressão linear de uma curva analítica utilizando etanol como padrão nas concentrações de 0 a 30 g L⁻¹.

Figura 11 - Representação esquemática da obtenção dos ensaios fermentativos 1 (sem suplementação) e 2 (com suplementação). HAH= hidrolisado ácido hemicelulósico. HDO= hidrolisado ácido hemicelulósico destoxificado por *overliming*. HDCA= hidrolisado ácido hemicelulósico destoxificado por carvão ativado. HDCA= hidrolisado ácido hemicelulósico destoxificado pela combinação dos métodos *overliming* e carvão ativado. SS= sem suplementação. CS= com suplementação.



Na fermentação 2 o bioprocesso foi monitorado a cada 4 horas e analisado conforme metodologia descrita na fermentação 1.

Os ensaios fermentativos foram conduzidos com duas repetições e as análises realizadas em triplicata. Os dados obtidos foram examinados por meio de análises de variância e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico OriginPro[®] Versão 8.

4.7 Parâmetros cinéticos da fermentação

Os processos fermentativos foram avaliados quanto às taxas de rendimento em etanol ($Y_{p/s}$, $g_{\text{etanol}} g_{\text{açúcar}}^{-1}$), calculado a partir da razão entre o etanol produzido e a glicose consumida; taxa de produtividade volumétrica (Q_p , $g L^{-1} h^{-1}$), calculada com base na concentração máxima de etanol e o respectivo tempo de fermentação; a eficiência fermentativa (E_f , %), conversão do açúcar a etanol, calculada com base na razão entre ($Y_{p/s}$) e o valor teórico de etanol ($0,511 g g^{-1}$) (SILVA *et al.*, 2011). Além destes, foram avaliadas a taxa específica de crescimento, μ_x , calculada com base na produção de biomassas por meio de análise por regressão linear, e tempo de geração (tg), tempo necessária para célula se dividir de acordo com Schmidell *et al.* (2001). Os parâmetros foram calculadas de acordo com as equações 5 a 9 abaixo. Considerando que o processo fermentativo 2 foi monitorado a cada 24 horas não foi possível apresentar as taxas de crescimento específico e tempo de geração.

$$Y_{p/s} = \frac{P}{S_0 - S} \quad (5)$$

$Y_{p/s}$: rendimento em etanol

P: concentração final de etanol ($g L^{-1}$)

S_0 : concentração inicial de açúcar redutor ($g L^{-1}$)

S: concentração final de açúcar redutor ($g L^{-1}$)

$$E_f = \frac{Y_{p/s}}{0,511} \times 100 \quad (6)$$

E_f : eficiência fermentativa

$Y_{p/s}$: rendimento em etanol

$$Qp = \frac{P}{t} \quad (7)$$

Qp: produtividade volumétrica

P: concentração de etanol

t: tempo de fermentação

$$\mu x = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt} \quad (8)$$

μx : taxa específica de crescimento

x: número de células

t: tempo

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu x} \quad (9)$$

tg: tempo de geração

μx : taxa específica de crescimento

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A torta de dendê foi facilmente cominuída e o preparo do hidrolisado foi reproduzido com facilidade dentro das condições previamente estabelecidas por Ferreira (2013) em estudos com hidrolisados ácidos hemicelulósicos de torta de dendê. A ampliação experimental da escala de trabalho do referido autor em 100 vezes possibilitou realizar um maior volume de trabalho.

Os resultados do efeito do processo de hidrólise na liberação de açúcares redutores, glicose, compostos fenólicos (CF), ácido acético (AcA), furfural e 5-hidroxi metilfurfural (HMF), bem como a influência dos tratamentos de destoxificação sobre a concentração destes componentes encontram-se na Tabela 5.

O tratamento ácido ocasionou a solubilização da hemicelulose, resultando em um HAH com elevada concentração de açúcares redutores (AR), com média de $83,10 \pm 1,60$ g L⁻¹. Estes resultados foram próximos ao relatado por Shupe & Liu (2012) que obtiveram $86,08$ g L⁻¹ em hidrolisado ácido hemicelulósico de resíduos florestais de carvalho (*Quercus* sp.). A concentração de glicose no hidrolisado ácido (HAH) foi baixa, apresentando valores de $0,91 \pm 0,02$ g L⁻¹. Sendo assim, pode-se inferir que a hidrólise ácida da torta de dendê não ocasionou uma quebra expressiva da molécula de celulose em monômeros de glicose. Todavia, esses resultados possibilitam deduzir haver uma alta concentração de pentoses (xilose) no meio do HAH, representando um percentual de até 98%. A baixa eficiência da hidrólise da celulose através da utilização de ácido diluído é relatada na literatura (JEONG *et al.*, 2014; KUNDU *et al.*, 2015; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016), assim como, sobre o favorecimento do processo quando submetido à temperatura elevada entre 230 e 240°C. Entretanto, o processo nestas condições fica mais susceptível a produção de coprodutos resultantes da degradação da glicose (GÍRIO *et al.*, 2010; NEGAHDAR *et al.*, 2016). Este efeito de degradação torna prejudicial o andamento da fermentação alcoólica, uma vez que os produtos gerados, por exemplo, o 5-hidroxi metilfurfural, é tóxico ao metabolismo das leveduras.

Os resultados obtidos provenientes dos efeitos dos tratamentos de destoxificação sobre os HAH evidenciaram que estes influenciaram na concentração do teor de açúcares redutores (TAB 5). Foi observado que o tratamento utilizando *overliming* e a combinação dos métodos de *overliming* e carvão ativado resultaram em uma diminuição de $56,4 \pm 7,3$ e $64,3\% \pm 4,0$ dos teores de açúcares redutores, respectivamente. Esse fato pode ter

ocorrido devido à degradação destes açúcares, pois de acordo com Amartey & Jeffries (1996), os íons de cálcio catalisam a degradação de monossacarídeos com os seus intermediários enolato. Mateo *et al.* (2013) também estudando hidrolisados ácidos de resíduos agrícolas da oliveira, observaram uma perda de massa nos teores de açúcares após estes hidrolisados terem sido submetidos ao processo de destoxificação por *overliming*. Millati *et al.* (2002) igualmente observaram o mesmo fenômeno ao destoxificar o hidrolisado ácido de resíduos florestais por *overliming*. Embora este tratamento apresente como desvantagem a perda de carboidratos, ainda tem sido utilizado nos processos de destoxificação devido à eficiência na remoção de compostos tóxicos e o baixo custo (CHI *et al.*, 2013; MATEO *et al.*, 2013; YUCEL *et al.*, 2015; MARTINEZ *et al.*, 2000).

O tratamento HDCA resultou em um aumento de $12,43 \pm 0,12\%$ nos teores de AR. Díaz *et al.* (2009) também observaram o mesmo efeito estudando hidrolisado de resíduos de oliveira e relataram que este fato é decorrente da evaporação da água durante a aplicação deste método de destoxificação que finda por concentrar estes açúcares.

Em relação a glicose foi observado que a partir dos três tratamentos de destoxificação aplicados, o com *overliming* foi o menos adequado devido seu elevado grau de remoção (42,8 %) deste açúcar. Alguns autores (YADAV *et al.*, 2011; CAMESASCA *et al.*, 2015 e GUPTA *et al.*, 2012) aplicando as mesmas condições de destoxificação com *overliming* em hidrolisados ácidos hemicelulósicos, relataram em seus estudos ter havido perda destes açúcares. Gupta *et al.* (2012) descreveram perdas de até 77% e Camesasca *et al.*, (2015) de até 50 % das pentoses e 60% das hexoses. Em contrapartida, Chi *et al.*, (2013) não observaram perdas significativas dos açúcares em seus processos de destoxificação e Yadav *et al.*, (2011) relataram ter havido apenas diminutas perdas do teor de açúcares (3%).

A maior dificuldade proveniente dos tratamentos ácidos de biomassa lignocelulósica advém da produção de inibidores que afetam o processo fermentativo. Dentre estes, o ácido acético, os compostos fenólicos, o furfural e o 5-hidroximetilfurfural (HMF). A seguir encontra-se uma abordagem sobre a concentração destes compostos no HAH de dendê, obtida neste estudo, bem como os efeitos dos processos de destoxificação na sua remoção.

Tabela 5. Composição química do hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê (HAH) antes e após os processos de destoxificação e efeito destes processos na remoção dos açúcares redutores, glicose, ácido acético, compostos fenólicos, furfural e o 5-hidroximetilfurfural (HMF).

Componente	Tratamentos			
	HAH	HDO	HDCA	HDOCA
AR (g L ⁻¹)	83,10 ± 1,60	60,74 ± 4,00	94,9 ± 0,64	62,38 ± 3,47
Glicose (g L ⁻¹)	0,91 ± 0,020	0,52 ± 0,01	1,06 ± 0,03	0,72 ± 0,01
CF (g L ⁻¹)	0,66 ± 0,030	0,443 ± 0,015	0,058 ± 0,009	0,026 ± 0,004
Ácido acético (g L ⁻¹)	12,02 ± 1,02	19,64 ± 1,80	16,65 ± 1,20	13,81 ± 1,10
Furfural (mg L ⁻¹)	489,50	246,20	3,37	2,84
HMF (mg L ⁻¹)	46,14	28,20	ND	ND

HAH= Sem tratamento de destoxificação; HDO= Destoxificação por *overliming*; HDCA= Destoxificação por carvão ativado e HDOCA= Destoxificação por combinação dos tratamentos com *overliming* e carvão ativado; HMF= 5-hidroximetilfurfural. AR= açúcares redutores; CF=Compostos fenólicos; ND= não detectado.

A concentração de ácido acético, composto formado a partir do grupamento cetila da hemicelulose, presente no hidrolisado ácido sem destoxificar foi de 12,02 g L⁻¹. Este valor é superior aos relatados na literatura para processos utilizando diferentes biomassas na produção do hidrolisado ácido hemicelulósico. Como por exemplo, podemos citar Trinh *et al.* (2014) que trabalhando com a hidrólise ácida do álamo amarelo relataram uma concentração inferior, 61% (7,33 g L⁻¹) no hidrolisado. Kundu & Lee (2016) do mesmo modo, estudando o hidrolisado ácido de eucalipto observaram uma concentração de ácido acético (6,34 g L⁻¹) inferior em cerca de 50% quando comparada aos valores encontrados neste estudo. Todavia, Kundu *et al.* (2015) ao estudar a hidrólise ácida do álamo amarelo observaram teores de ácido acético próximos ao encontrados neste estudo, com concentração de 11,25 g L⁻¹. De forma semelhante, Brás *et al.* (2014) observaram valores de 13,52 g L⁻¹ deste ácido no hidrolisado ácido hemicelulósico do bagaço de

azeitona. Sendo assim, foi possível inferir que nas condições de hidrólise empregada, o ácido diluído (5,33%) à 121°C, desencadeou no processo de hidrólise da torta de dendê a coprodução de ácido acético, a qual ocorre a partir dos grupamentos acetila da hemicelulose. Em relação ao ácido acético não foi observado nenhum efeito dos tratamentos de destoxificação na remoção destes compostos. Yucel e Asku (2015), também relataram que não obtiveram efeito dos tratamentos de destoxificação na remoção do ácido acético presente no hidrolisado ácido hemicelulósico da polpa de beterraba.

Os compostos fenólicos, formados durante o processo de hidrólise ácida, provenientes da degradação da lignina, causam perda da integridade da membrana celular microbiana afetando sua capacidade de seletividade (HEIPIEPER *et al.*, 1994). Neste estudo a concentração de compostos fenólicos (CF) encontrada no HAH sem tratamento de destoxificação foi de 0,66 g L⁻¹ (Tabela 6). Estes valores quando comparados com dados relatados na literatura provenientes de hidrolisados hemicelulósicos de diferentes matérias-primas pode ser considerado baixo, pois, teores variando de 1,57 a 3,76 g L⁻¹ de CF foram relatados em diferentes hidrolisados ácido hemicelulósicos tais como, polpa de beterraba (YUCEL & ASKU, 2015), resíduos agrícolas de oliveira (MATEO *et al.*, 2013) e espiga de milho (GUPTA *et al.*, 2012). A baixa concentração de CF foi satisfatória, pois indica pouca influência da hidrólise ácida na degradação da lignina, o que leva a uma baixa concentração destes compostos no meio diminuindo a possibilidade de inibição do processo fermentativo.

Os furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural), potentes inibidores microbianos, são disponibilizados em função da hidrólise ácida, em concentrações relativamente altas. No HAH da torta de dendê foram observados valores na ordem de 0,49 ± 0,004 g L⁻¹ de furfural e 0,046 ± 0,003 g L⁻¹ de 5-hidroximetilfurfural. Estes compostos são, provavelmente, os mais importantes grupos de inibidores, uma vez que interferem no sucesso do processo de fermentação do hidrolisado ácido hemicelulósico, afetando fortemente a produção de etanol que segundo Mateo *et al.* (2013) é inversamente proporcional a concentração destes compostos no meio. O furfural, assim como o 5-hidroximetilfurfural são conhecidos por reduzir as atividades de enzimas essenciais no processo fermentativo como, álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase e piruvato desidrogenase (MODIG *et al.*, 2002). Guo *et al.* (2008) relatam que estes compostos quando presentes em concentração acima de 1g L⁻¹ já dificultam a atividade metabólica da levedura *Scheffersomyces stipitis* no que diz respeito à fermentação alcoólica.

Ao obter a concentração dos furanos no processo de hidrólise estudado, foi possível observar que o furfural estava presente em uma concentração 10 vezes mais elevada que o 5-hidroximetilfurfural. Este fato pode estar atrelado à alta concentração de pentoses no meio de fermentação, pois, o ácido empregado no processo de hidrólise que libera pentoses, de forma majoritária a xilose, também é responsável pela desidratação das mesmas, indicando assim, ter ocorrido este fenômeno químico, ou seja, desidratação. Todavia, a concentração obtida destes compostos no presente estudo, ainda foram inferiores a alguns relatos na literatura. Kundu & Lee (2016) estudando hidrolisado ácido hemicelulósico de eucalipto, Kundu *et al.* (2015) estudando hidrolisado ácido hemicelulósico do álamo amarelo e Jeong *et al.* (2014) estudando o hidrolisado ácido da mistura de madeiras de lei (*Quercus mongolica*, *Robinia pseudoacacia L.* e *Castanea crenata*), obtiveram valores de furfural de 0,71 g L⁻¹, 1,43 g L⁻¹ e 2,72 g L⁻¹, respectivamente. Esses dados correspondem a valores de 31,00; 65,73 e 82,00 % maior que os encontrados neste estudo. Em se tratando do 5-hidroximetilfurfural, estes autores, para os mesmos hidrolisados já mencionados, relataram ter obtido valores de 0,12 g L⁻¹, 0,19 g L⁻¹ e 0,91 g L⁻¹, o que demonstra que estes autores também obtiveram para estes compostos valores superiores (61,60%; 75,79% e 94,94%) aos encontrado no HAH de dendê.

Em se tratando do efeito dos métodos de destoxificação no HAH da torta de dendê foi observado que, aqueles aplicando tratamentos combinados (HDOCA) e carvão ativado (HDCA) foram os mais eficientes na remoção dos compostos fenólicos, furfural e 5-hidroximetilfurfural.

Na Tabela 5, encontram-se os dados obtidos no processo de remoção destes compostos, e por meio destes, foi possível notar que estes foram quase que completamente removidos ao aplicar os métodos de carvão ativado e combinação dos métodos (HDOCA). A remoção pelo método overliming foi a menos eficiente das técnicas de destoxificação empregada, apresentando valores de remoção de compostos fenólicos, furfural e 5-hidroximetilfurfural na ordem de: 65,00±5,80 %; 50,30±4,20 % e 38,80±3,60 %, respectivamente, pois, os demais métodos, obtiveram percentuais de remoção superior a 90% para estes compostos.

Alguns autores relataram em seus estudos que observaram uma taxa de remoção semelhante à obtida empregando o método de destoxificação por carvão ativado. Mateo *et al.* (2013) estudando hidrolisado ácido hemicelulósico dos resíduos de oliveira obtiveram 98% de remoção dos furanos e 81% dos compostos fenólicos, Lee *et al.* (2011)

avaliando o hidrolisado ácido de chips de carvalho obtiveram 95,9% de remoção de 5-hidroximetilfurfural e 92,5% de furfural, do mesmo modo, Yucel & Asku (2015), também relataram que obtiveram remoção de 98% de furanos e 71% dos compostos fenólicos analisando o hidrolisado ácido hemicelulósico dos resíduos da beterraba açucareira. Em se tratando da remoção dos compostos fenólicos pelo método do carvão ativado, os resultados obtidos neste estudo foram 12% superior ao encontrado por Mateo *et al.* (2013) e 22,7% superior ao relato por Yucel & Asku (2015).

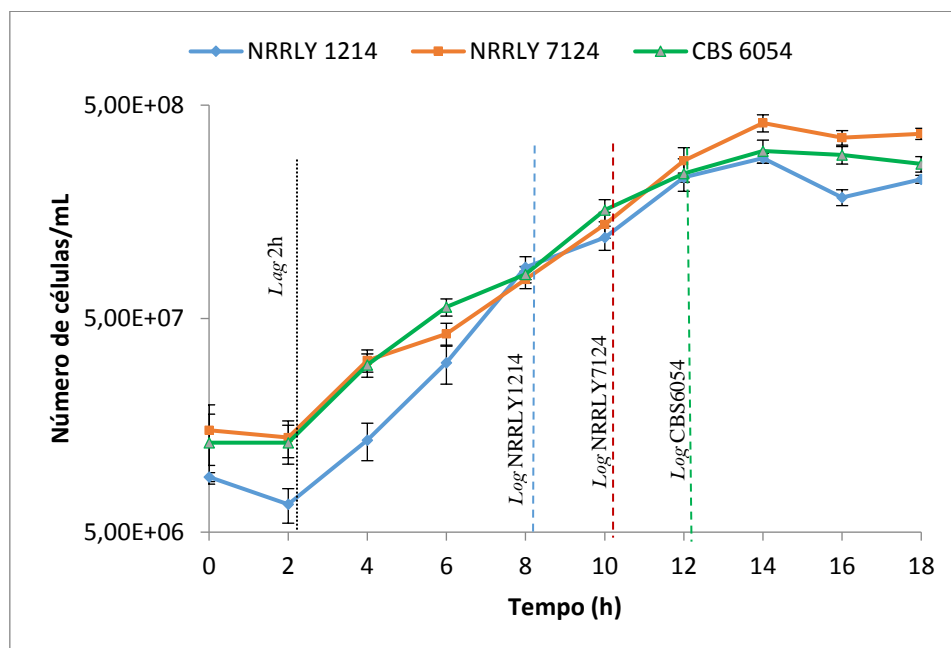
Em se tratando do efeito do processo de destoxificação foi possível observar de forma geral, que os tratamentos envolvendo *Overliming* foram os que tiveram maior efeito negativo, pois removeram os maiores percentuais de açúcares. Em contrapartida, o HDCA foi considerado neste estudo, como sendo o melhor tratamento para destoxificar HAH de torta de dendê, uma vez que apresentou as menores taxas de remoção de açúcares e os maiores percentuais de remoção de furfural e compostos fenólicos, apresentando valores superiores a 93 %, além da remoção completa dos HMF.

5.1 Perfil do crescimento das linhagens de *Scheffersomyces stipitis*

Na Figura 12 encontra-se o perfil do crescimento celular das três linhagens de *Scheffersomyces stipitis* (NRRLY1214, NRRLY 7124 e CBS 6054) estudadas. Nos dados obtidos foi observado que todas as linhagens, quando cultivadas no meio sintético (MSI), apresentaram período de adaptação semelhante entre si, apresentando uma fase *Lag* com duas horas de duração. No entanto, a fase exponencial (fase *Log*) foi distinta entre as três linhagens (NRRLY1214, NRRLY 7124 e CBS 6054), com duração de 8, 10 e 12 horas, respectivamente. No final da fase *Log*, para as respectivas linhagens estudadas, foi observado uma população de células na concentração de $2,29 \times 10^8$; $4,13 \times 10^8$ e $1,61 \times 10^8$ células mL^{-1} . A taxa específica de crescimento para tais linhagens foi de $0,30 \mu\text{x h}^{-1}$; $0,34 \mu\text{x h}^{-1}$ e $0,28 \mu\text{x h}^{-1}$. Por meio destes dados foi possível observar que a linhagem NRRLY 7124 apresentou um maior aumento da concentração de biomassa em função do tempo nestas condições de cultivo (meio MSI, 30 °C, 128 rpm). Sendo assim, considerando que a taxa de crescimento específica é diretamente proporcional à velocidade de crescimento da população, as linhagens, NRRLY 1214 e CBS 6054 foram as que apresentaram maior velocidade de crescimento. Em se tratando do tempo de geração foram observados valores de 2,21h, 1,97h e 2,45h para as respectivas linhagens.

Portanto, considerando a taxa específica de crescimento foi possível inferir que o tempo de geração para essas linhagens foi constante.

Figura 12 - Perfil do crescimento celular das linhagens de *Scheffersomyces stipitis* (CBS 6054, NRRLY 1214 e NRRLY 7124) cultivadas em meio sintético (MSI) à 30°C, 128 rpm.



Fonte: O AUTOR.

5.2 Perfil fermentativo das linhagens de *Scheffersomyces stipitis* nos HAH de torta de dendê sem diluição em meio suplementado (ns), com e sem destoxificação

As Figuras 13 A, B, C e D apresentam o perfil do processo fermentativo das linhagens de *S. stipitis* avaliadas nos diferentes hidrolisados (HAHns, HDOns, HDCAns e HDOCAns) sem diluição em meio suplementado MSII. Na Figura 14 A, B, C e D encontram-se o perfil do crescimento celular das linhagens estudadas com base na contagem de células em câmara de Neubauer e densidade óptica DO_{600nm} , respectivamente, nos meios de fermentação (HAHns, HDOns, HDCAns e HDOCAns). Os resultados permitiram observar que houve um comportamento semelhante entre os dados obtidos pelos dois métodos de quantificação celular, com exceção do meio HAHns. Após 24 horas de crescimento foi observado que as três linhagens estudadas, apresentaram um padrão estável de crescimento, sugerindo encontrar-se na fase estacionária. Este período foi relativamente curto quando comparado ao comportamento

observado para estas linhagens no meio de fermentação com suplementação (MSI) que levaram no mínimo 52 horas para refletir esse comportamento.

Os processos fermentativos foram acompanhados até estabilização do consumo de açúcares redutores e crescimento celular e tiveram duração de 144 horas.

Em todos os meios utilizados para fermentação, com ou sem destoxificação, foram observados crescimento celular, porém, tratando-se da produção de etanol, foi observado produção somente naqueles meios os quais receberam tratamento de destoxificação. Este fato evidencia um melhor desempenho das linhagens quando os meios são submetidos a estes tratamentos.

No meio de fermentação elaborado sem tratamento destoxificação (HAHns), apesar de ter sido observado crescimento celular não foi constatado nenhuma produção de etanol. Este fato corrobora que as linhagens estudadas são tolerantes as condições adversas dos meios de fermentação empregados, porém, a quantidade de compostos tóxicos presentes, certamente interferiram de forma negativa no metabolismo das três linhagens de leveduras influenciando na produção de etanol. Gutiérrez-Rivera *et al.* (2015) estudando processo de fermentação com hidrolisado ácido hemicelulósico de bagaço de cana utilizando *S. stipitis* NRRLY 7124 como agente fermentativo, também observaram que apesar da baixa produção de etanol, a levedura foi capaz de crescer em um meio com 100% de hidrolisado e concentração de 4,5 g L⁻¹ de ácido acético, 0,5 g L⁻¹ de furfural e 0,03 g L⁻¹ de 5-hidroximetilfurfural.

Kundu & Lee (2016) relataram que a levedura *S. stipitis* é altamente sensível aos inibidores produzidos durante a hidrólise ácida e que a presença de 1,5g L⁻¹ de furfural reduz a eficiência fermentativa em 90% no hidrolisado ácido de resíduos agroindustriais, e ainda que, a presença de ácido acético em concentração acima de 7g L⁻¹ reduz o crescimento celular em até 71% e a produção de álcool em 93%. Por outro lado, Kundu *et al.* (2015) relataram que o teor de furanos acima de 2 g L⁻¹ e concentração de ácido acético acima de 11 g L⁻¹ inviabilizaram o crescimento e a atividade metabólica da levedura *Pichia stipitis* CBS 6054 no hidrolisado ácido hemicelulósico de resíduos florestais. Apesar da concentração de furfural nos meios de fermentação estudada se encontrar abaixo de 1,5g L⁻¹, o teor de ácido acético está na faixa de 41,60% superior ao relatado.

Um outro fato que pode ter contribuído para o menor desempenho destas linhagens frente a produção de etanol pode estar relacionado com a falta de determinados nutrientes no meio de fermentação. Guitierrez-Rivera *et al.* (2015), que reportam que

fontes nutricionais, tais como nitrogênio, enxofre, fósforo e diversos sais, são essenciais para o desenvolvimento e manutenção das células, e ainda, produção de etanol. Camesasca *et al.* (2015) estudando fermentação do hidrolisado ácido hemicelulósico do capim elefante utilizando a levedura *S. stipitis* NBRC 10063 como agente fermentativo, também observaram não haver produção de etanol em meios fermentativos composto por hidrolisado ácido (puro) sem destoxificação. Todavia, estes autores perceberam que quando o meio recebeu tratamento de destoxificação, no caso por *overliming*, observaram uma eficiência fermentativa de 66%.

Não foi observado um consumo total dos açúcares disponíveis nos meios de fermentação pelas três linhagens em todos os meios e condições de fermentação empregada. A maior porcentagem de consumo de açúcares redutores foi observada no meio fermentativo, destoxificado por *overliming* (HDOs), com cerca de 50% de consumo dos açúcares pelas linhagens NRRLY 1214 e CBS 6054.

No meio contendo o hidrolisado ácido sem tratamento de destoxificação (HAHns) o consumo de açúcar foi de 25,33% pela linhagem CBS 6054. Nos meios destoxificados por carvão ativado (HDCAns) e pela combinação carvão ativado e *overliming* (HDOCAns) o consumo de açúcares redutores foi de 37 e 25%, respectivamente, ambos alcançados pela linhagem CBS 6054. O comportamento da linhagem CBS6054 frente ao HAHns demonstrou que esta pode ser considerada como a mais vigorosa entre as linhagens estudadas, uma vez que apresentou melhor consumo de açúcares redutores no meio sem tratamento de destoxificação.

Na Tabela 6 encontra-se os resultados da produção de etanol no final do processo fermentativo, o rendimento em etanol ($Y_{p/s}$ g_{etanol} g_{açúcar}⁻¹), a eficiência fermentativa (E_f %) e a produtividade volumétrica (Q_p g L⁻¹ h⁻¹) alcançadas pelas linhagens estudadas (CBS 6054, NRRLY 1214 e NRRLY 7124) nos diferentes meios fermentativos não suplementados (HAHns, HDOs, HDCAns e HDOCAns). Em reflexo à baixa produção de etanol, os valores de $Y_{p/s}$, E_f e Q_p não apresentaram valores expressivos em nenhum dos hidrolisados estudados.

A baixa produção etanol pode estar atrelada à alta concentração de ácido acético, 12 g L⁻¹ (não removido por nenhum tratamento), e ausência de suplementos nutricionais. Sendo assim, foi realizado novos ensaios fermentativos dos meios com e sem tratamento de destoxificação submetidos a uma diluição na proporção de 1:1 em meio suplementado (MSII). Os resultados destes ensaios estão apresentados no item 5.3.

Figura 13. Perfil do consumo de açúcares redutores (AR) e do crescimento celular de *S. stipitis* (CBS 6054, NRRLY 1214 e NRRLY 7124) nos hidrolisados não suplementados com meio MSII: HDOns = Destoxificação por *overliming* (A); HDOCans = Destoxificação por combinação dos tratamentos com *overliming* e carvão ativado (B); HDCAns = Destoxificação por carvão ativado (C) e HAHns = Sem tratamento de destoxificação (D).

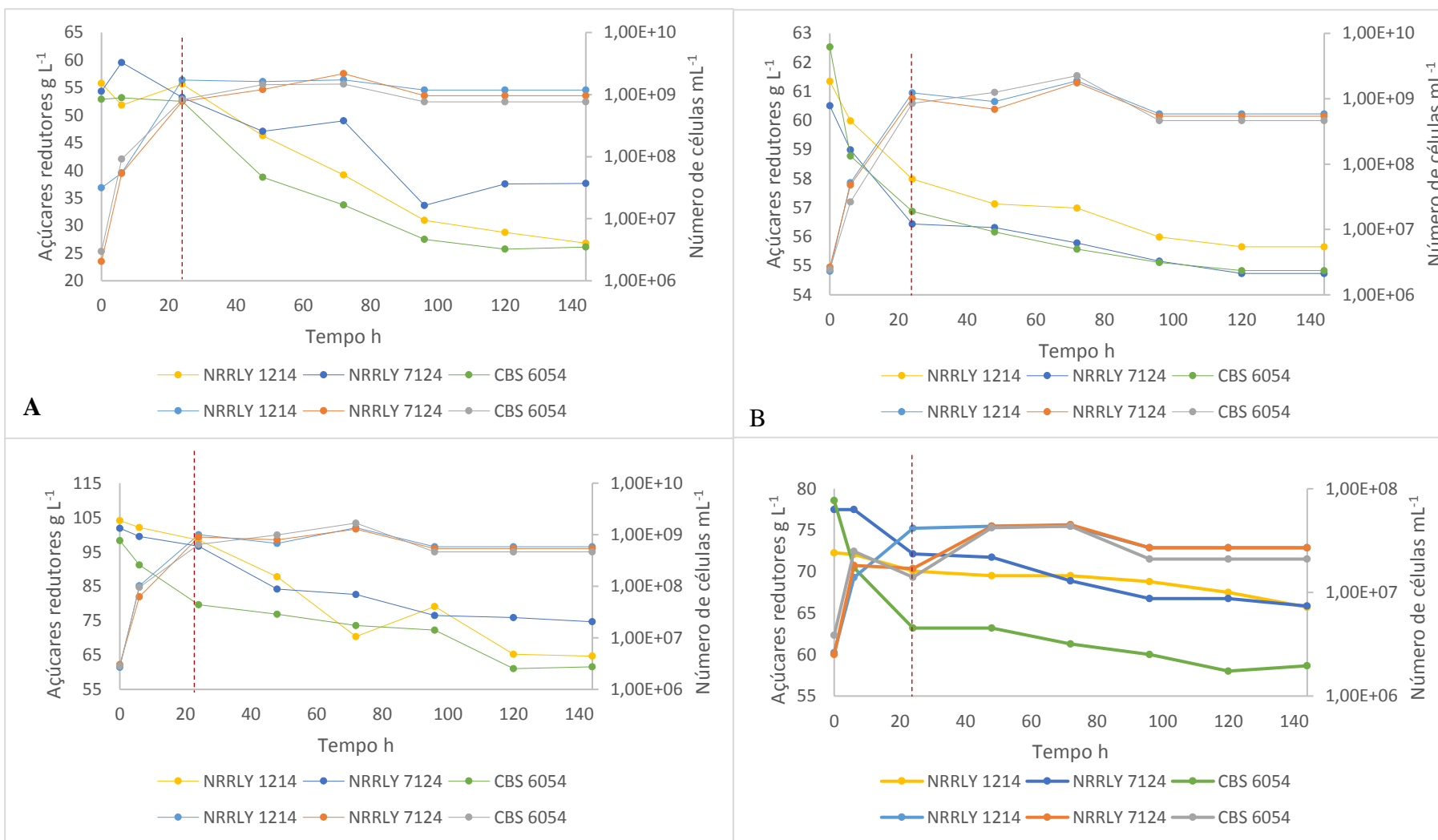


Figura 14. Perfil do crescimento celular baseado na leitura direta da densidade óptica D.O_{600 nm} das linhagens de *S. stipitis* (CBS C 6054, NRRLY 1214 e NRRLY 7124) nos hidrolisados não suplementados com meio MSII: HDOns = Destoxificação por *overliming* (A); HDOCAns = Destoxificação por combinação dos tratamentos com *overliming* e carvão ativado (B); HDCAns = Destoxificação por carvão ativado (C) e HAHns = Sem tratamento de destoxificação (D).

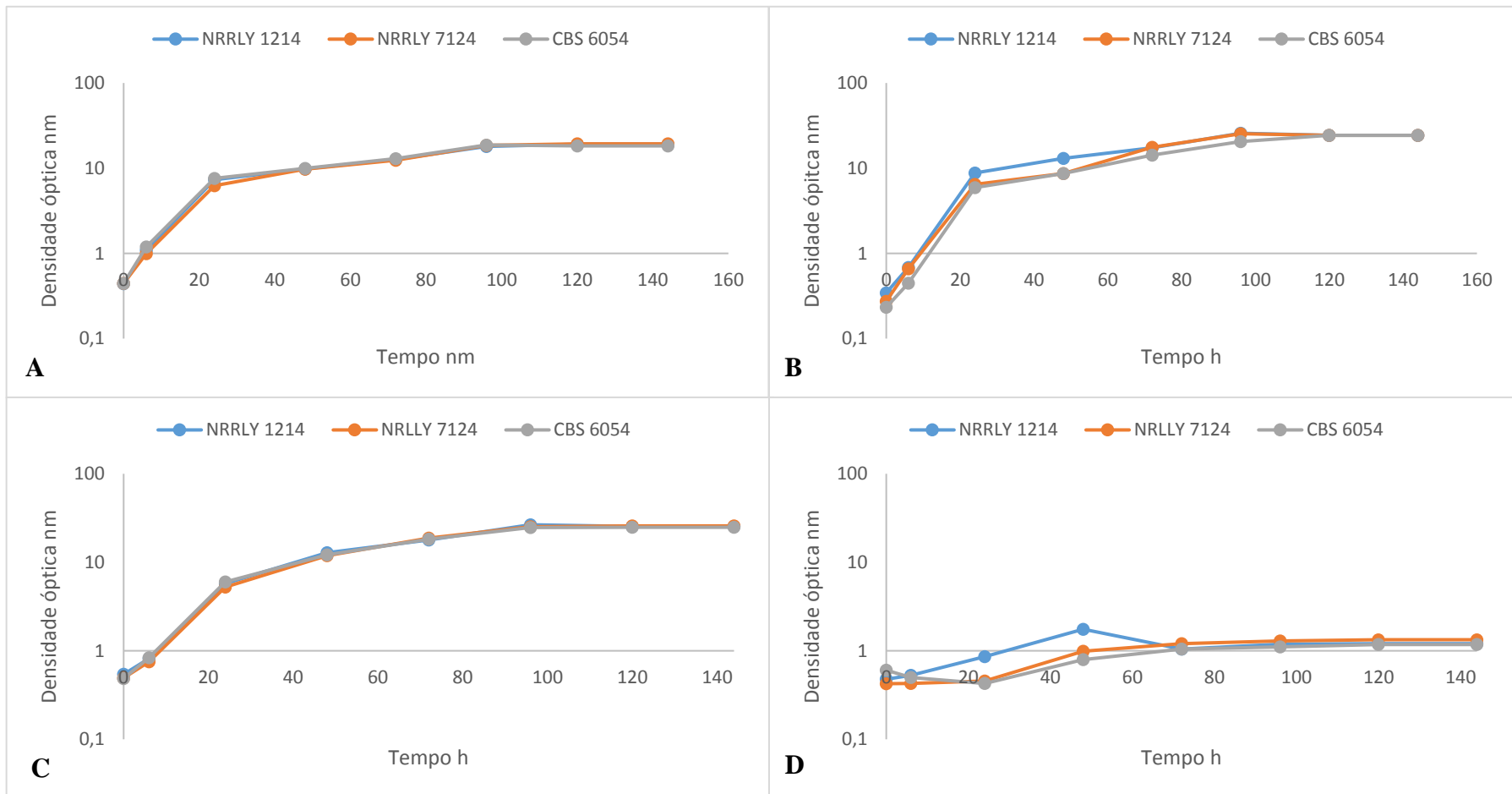


Tabela 6: Concentração de etanol, rendimento de etanol ($Yp/s_{\text{getanol}} \text{ g}_{\text{açúcar}}^{-1}$), eficiência fermentativa (Ef %), produtividade volumétrica ($Qp \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e crescimento máximo específico ($\mu_{\text{x}} \text{ h}^{-1}$) das linhagens de leveduras de *S. stipitis* (CBS 6054, NRRLY 1214 e NRRLY 7124) frente aos hidrolisados ácidos hemicelulósicos não suplementados e seus respectivos tratamentos de destoxificação (HAHns, HDOns, HDCAns e HDOCAns).

Amostra de hidrolisado	Linhagem de levedura	Etanol Final (g L^{-1})	Rendimento de etanol Yp/s ($\text{g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{açúcar}}^{-1}$)	Produtividade Volumétrica Qp ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Eficiência fermentativa (Ef %)
HDOns	NRRLY 1214	$0,48 \pm 0,15^a$	$0,01 \pm 0,03^a$	$0,003 \pm 0,002^a$	$2,4 \pm 1,60$
	NRRLY 7124	$0,59 \pm 0,30^a$	$0,02 \pm 0,02^a$	$0,004 \pm 0,003^a$	$4,6 \pm 4,46$
	CBS6054	$0,55 \pm 0,30^a$	$0,01 \pm 0,01^a$	$0,003 \pm 0,003^a$	$2,9 \pm 3,07$
HDOCAns	NRRLY 1214	$0,83 \pm 0,40^b$	$0,12 \pm 0,01^b$	$0,005 \pm 0,004^b$	$2,4 \pm 1,60$
	NRRLY 7124	$0,83 \pm 0,30^b$	$0,07 \pm 0,01^b$	$0,005 \pm 0,005^b$	$4,6 \pm 4,46$
	CBS6054	$0,17 \pm 0,30^c$	$0,008 \pm 0,01^c$	$0,001 \pm 0,004^c$	$2,9 \pm 3,07$
HDCAns	NRRLY 1214	$0,69 \pm 0,15^c$	$0,02 \pm 0,03^d$	$0,004 \pm 0,005^d$	$4,7 \pm 2,84$
	NRRLY 7124	$0,80 \pm 0,30^c$	$0,04 \pm 0,02^d$	$0,005 \pm 0,007^d$	$9,4 \pm 8,16$
	CBS6054	$0,069 \pm 0,30^d$	$0,002 \pm 0,01^e$	$0,0004 \pm 0,002^e$	$0,5 \pm 4,96$
HAHns	NRRLY 1214	ND	ND	ND	ND
	NRRLY 7124	ND	ND	ND	ND
	CBS 6054	ND	ND	ND	ND

HDOns = Destoxificação por *overliming* (A); HDOCAns = Destoxificação por combinação dos tratamentos com *overliming* e carvão ativado (B); HDCAns = Destoxificação por carvão ativado (C) e HAHns = Sem tratamento de destoxificação (D). ND= não detectado.

5.3 Perfil fermentativo das linhagens de *Scheffersomyces stipitis* nos HAH de torta de dendê diluídos em meio suplementado, com e sem destoxificação

Os resultados concernentes ao desempenho de consumo de açúcares redutores e crescimento celular das linhagens de *S. stipitis* no processo fermentativo empregando meio hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de dendê diluídos em meio suplementado (HAHs), com e sem tratamento de destoxificação (HAHs, HDOs, HDCAs e HDOCAs), encontram-se apresentados na Figura 15 A, B, C e D. Os processos fermentativos realizados com os diferentes hidrolisados ácidos hemicelulósicos da torta de dendê, independente dos tratamentos aplicados, tiveram duração de 90 horas. Em se tratando do crescimento celular no meio de HAHs, com e sem destoxificação, foi observado que as linhagens estudadas cresceram de forma congruente. O fato de ter havido crescimento nestes meios fermentativos, demonstra que as linhagens de leveduras testadas apresentam certa tolerância aos componentes inibidores nas concentrações existentes nos meios, as quais após a diluição, presumivelmente, se encontram nas concentrações de 0,245 g L⁻¹ de furfural, 0,023 g L⁻¹ de 5-Hidroximetilfurfural, 6,01 g L⁻¹ de ácido acético e 0,33 g L⁻¹ de compostos fenólicos.

No processo fermentativo realizado com o meio HAHs destoxificado por *Overlimig* foi observada, para a linhagem CBS 6054, a maior concentração de células ao final do processo (1,23x10⁹). A linhagem NRRLY7124 apresentou concentração de células equivalente a CBS 6054 até 47 horas de fermentação, após este período apresentou um decaimento celular expressivo em 65,20%, quando comparado ao crescimento da linhagem CBS 6054.

O fato das células terem sido inoculadas no meio de fermentação já em fase de crescimento exponencial resultou na ausência de uma fase de adaptação celular. Esse fato, de forma positiva, contribuiu para um menor tempo de fermentação.

As três linhagens apresentaram um perfil de crescimento semelhante entre si nos meios de fermentação tratados pelos métodos de carvão ativado (HDCAs), combinado (HDOCAs), e sem tratamento de destoxificação (HAHs).

Em relação ao consumo dos açúcares para as três linhagens estudadas, foram observadas, nos meios de fermentação com HAHs de torta de dendê destoxificado pelo método *Overliming* (HDOs) e o combinado (HDOCAs), as maiores eficiências de consumo, acima de 90%. Nos meios HDCA e HAH foram observadas que a eficiência de consumo de açúcares redutores variaram entre 51,57 e 68,13 %. Este fato evidencia que

a concentração de inibidores (ácido acético, compostos fenólicos, furfural e 5-hidroxiacetilfurfural), presente nos meios de fermentação tratados pelos diferentes técnicas de destoxificação (HDOs, HDCAs, HDOCA), não foi um fator limitante para as linhagens em relação ao consumo de açúcares, uma vez que no meio contendo a maior concentração destes inibidores, HDOs, foi onde houve a maior taxa de consumo de açúcares, acima de 90%. Todavia, no HAHs foi observado para as três linhagens estudadas, a menor velocidade de consumo dos açúcares redutores. Pois, ao final de 90h, ainda havia em torno de 19,56 a 20,4 g L⁻¹ de açúcares no processo, o que representou no mínimo 46,42% de açúcares remanescentes.

Na Tabela 7 encontram-se os resultados da produção de álcool das linhagens de *S. stipitis* nas diferentes condições de hidrólise estudada, bem como, as variáveis de resposta dos processos fermentativos. Em relação à produção de etanol foram observadas as maiores produção para as linhagens NRRLY1214 e NRRLY7124 no meio HDOs com respectivos valores de 6,2 g L⁻¹ e 6,13 g L⁻¹, seguido do meio HDCAs com valores de 4,8 g L⁻¹ e 5,2 g L⁻¹, para as mesmas linhagens.

Ao comparar o desempenho da produção de etanol entre as três linhagens estudadas frente aos diferentes meios de fermentação empregados (TAB 7 e TAB 8), foi observado que: as linhagens NRRLY1214 e NRRLY7124 apresentaram as melhores taxas de produção de etanol e que estas não diferiram entre si; que a linhagem NRRLY1214 apresentou taxas de produção de etanol que diferiram estatisticamente entre os meios de fermentação utilizados; que a linhagem NRRLY7124 não apresentou diferença estatística entre as taxas de produção de etanol obtidas nos meios de fermentação HDOCA e HDCAs, mas diferiram dos demais meios, e que o menor desempenho na produção de álcool observado para estas linhagens ocorreu no meio HAHs.

Em se tratando da linhagem CBS6054 foi observado um desempenho fermentativo inferior às demais linhagens no que tange a produção de álcool nos meios estudados. Estatisticamente, não foi observada diferença na produção de álcool para a linhagem CBS6054 entre os meios HDOs, HDOCA e HDCAs (Tabela 7), entretanto, foi observada diferença estatística, para este parâmetro, entre os meios HDCAs e HAHs. A concentração de etanol produzida por essa linhagem nos diferentes meios fermentativos variou entre 2,4 e 3,6 g L⁻¹. A menor taxa de produção de etanol (2,0±0,16 g L⁻¹) foi obtida no meio HAHs pela linhagem NRRLY7124 e a maior taxa (6,2±0,15 g L⁻¹) foi obtida no meio HDOs pela linhagem NRRLY1214. Comparando estas taxas, ou seja, a

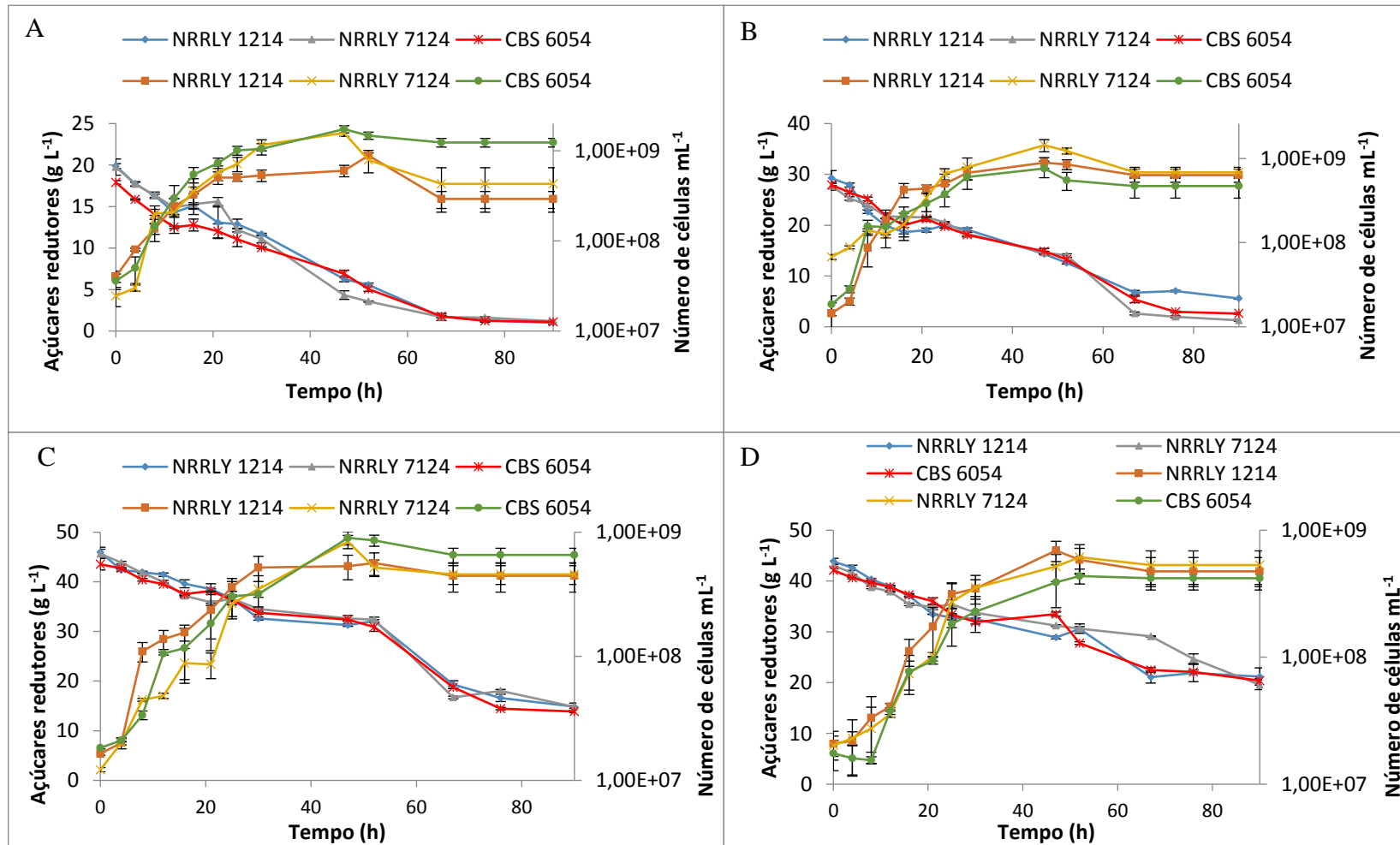
menor taxa de produção de etanol obtida, com a maior foi possível observar uma diferença de produção de etanol de 67,74%. O baixo valor de etanol obtido no meio HAHs, provavelmente, deve-se, ao fato do meio de fermentação não ter recebido tratamento de destoxificação.

Os melhores valores de rendimento, $Y_{p/s}$ ($0,33 \pm 0,02 \text{ g g}^{-1}$) e produtividade volumétrica, Q_p , ($0,068 \pm 0,003 \text{ g g}^{-1}$) foram alcançadas pela linhagem NRRLY7124 no meio HDOs. Em contrapartida, as taxas mais baixas, $Y_{p/s}$ e Q_p , com valores de $0,10 \pm 0,001 \text{ g g}^{-1}$ e $0,022 \pm 0,001 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, foram apresentadas pelas linhagens NRRLY1214 e NRRLY7124, respectivamente, no meio HAHs. Este fato evidencia que os compostos tóxicos nas concentrações encontradas no meio HDOs foram menos nocivos sobre o desempenho fermentativo desta linhagem (NRRLY7124) quando comparados às concentrações de compostos tóxicos presentes no meio HAHs. O rendimento em álcool para as linhagens NRRLY 1214 e NRRLY7124, no meio HDOs, foi 65% maior quando comparadas com o meio sem destoxificação (HAHs).

De forma geral (TAB 7 e TAB 8), foi observado que todas as linhagens, independente das condições de destoxificação aplicadas nos meios de fermentação, apresentaram taxa de crescimento específica, sendo esta de no mínimo $0,07 \mu\text{x h}^{-1}$. Este fato nos leva a crer que as linhagens estudadas não foram completamente inibidas quanto ao seu crescimento nas concentrações de compostos tóxicos presentes nos meios de fermentação suplementados. Segundo His (2009) a taxa específica de crescimento pode ser interpretada como o aumento relativo da biomassa referente ao intervalo de tempo. Deste modo, para a maior taxa de crescimento observada, $0,22 \mu\text{x h}^{-1}$, para a linhagem NRRLY1214 no meio HDOCA, tem-se um crescimento de 22% de biomassa no intervalo de tempo de uma hora.

No meio HDOs, onde houve baixas taxas de remoção dos compostos tóxicos foram observadas taxas de crescimento semelhantes àqueles meios cuja destoxificação removeu mais de 90% destes compostos. O tratamento utilizando *overliming* provavelmente pode ter removido compostos inibidores não mensurados neste estudo tais como, ácido fórmico, ácido levulínico, ácido ferúlico e vanilina.

Figura 15. Perfil do consumo de AR e do crescimento celular das linhagens de *Scheffersomyces stipitis* (CBS 6054, NRRLY 1214 e NRRLY 7124) nos meios suplementados: HDOs= Destoxificação por *overliming* (A); HDOCAs= Destoxificação por combinação dos tratamentos com *overliming* e carvão ativado (B); HDCAs= Destoxificação por carvão ativado (C) e HAHs= Sem tratamento de destoxificação (D).



Quanto a eficiência fermentativa foi observada que as linhagens NRRLY1214 e NRRLY7124 produziram as melhores taxas (64,46 e 64,89%) no meio HDOs. As menores taxas de *Ef* foram observadas no meio sem tratamento de destoxificação (HAHs) para as três linhagens estudadas, sendo o menor valor apresentado pela linhagem NRRLY7124, com valor de *Ef* 16,30±5,96 %.

Quanto aos valores de rendimento e produtividade foi observado que entre as linhagens estudadas não houve diferença significativa ($p < 5\%$) frente ao hidrolisado sem tratamento de destoxificação (HAHs) e tratado com carvão ativado (HDCAs). As variáveis de resposta, *Yp/s* e *Qp* para as linhagens NRRLY 1214 e NRRLY 7124 não diferiram estatisticamente entre si no meio HDOs e HDOCAs.

Os valores de *Yp/s* e *Ef* obtidos no meio HDOs foram similares a alguns relatos da literatura. Camesasca *et al.* (2015) estudando fermentação alcoólica frente ao hidrolisado ácido hemicelulósico do capim elefante destoxificado com *overliming* obteve taxas de *Yp/s* de 0,34±0,002 g_{etanol} g_{açúcar}⁻¹ e *Ef* de 66% utilizando a linhagem de NBRC 10063. Gupta *et al.* (2012), também utilizando *Pichia stipitis* na fermentação do hidrolisado ácido da espiga de milho destoxificado com carvão ativado, obteve rendimento em etanol de 0,31±0,001 g_{etanol} g_{açúcar}⁻¹ e *Ef* 60% com 60 horas de fermentação. Huang *et al.* (2009), descreveram resultados superiores aos aqui apresentados, para *Yp/s* (0,37±0,001 g_{etanol} g_{açúcar}⁻¹) e *Ef* (72%) na fermentação alcoólica do hidrolisado ácido hemicelulósico da palha de arroz utilizando a levedura *Pichia stipitis* BCRC21777 como agente fermentativo, todavia, aplicando técnicas de aclimação microbiana no próprio hidrolisado.

Os resultados relacionados ao desempenho das linhagens quanto ao consumo de açúcares redutores e glicose das linhagens de *S. stipitis* no processo fermentativo empregando HAH da torta de dendê suplementados, sem e com tratamento por diferentes métodos de destoxificação (HAHs, HDOs, HDCA e HDOCAs), encontram-se apresentados na Figura 16 A, B, C e D.

Figura 16 - Perfil do consumo de AR e glicose das linhagens de *Scheffersomyces stipitis* (CBS 6054, NRRLY 1214 e NRRLY 7124) em meios suplementados: HDO= Destoxificação por *overliming* (A); HDOCA= Destoxificação por combinação dos tratamentos com *overliming* e carvão ativado (B); HDCA= Destoxificação por carvão ativado (C) e HAH= Sem tratamento de destoxificação (D).

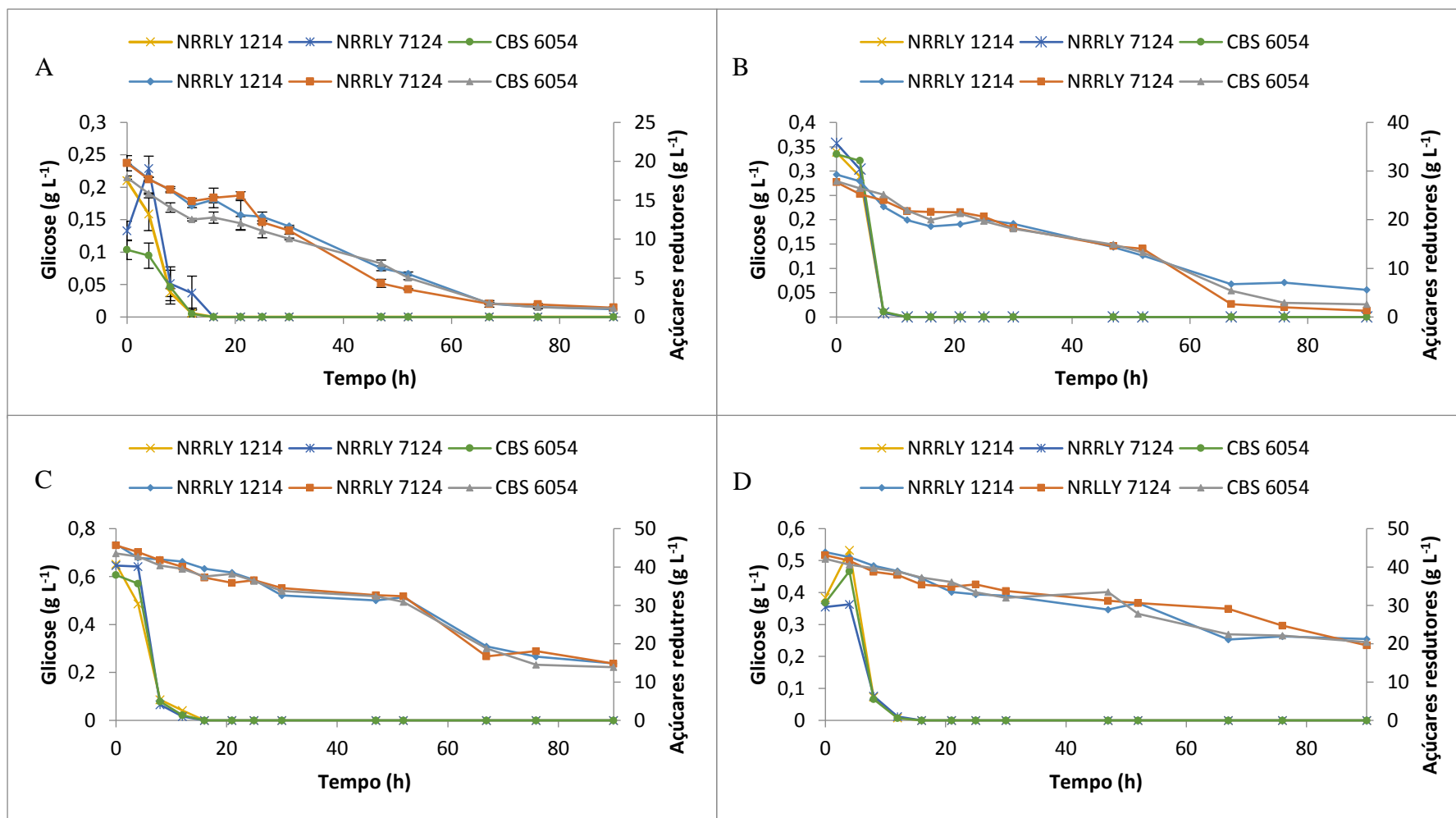


Tabela 7 - Dados dos parâmetros fermentativos (etanol, $ETHO_f$; rendimento de etanol, Yp/s $g_{etanol}g_{açúcar}^{-1}$; eficiência fermentativa, Ef %; produtividade volumétrica, Qp $g L^{-1} h^{-1}$; e crescimento máximo específico, μx h^{-1}), obtidos para as três linhagens das linhagens de leveduras de *S. stipitis* (CBS 6054, NRRLY 1214 e NRRLY 7124) frente aos hidrolisados ácidos hemicelulósicos e seus respectivos tratamentos de destoxificação.

Meios Fermentativos	Linhagens de leveduras	Etanol final $ETHO_f$ ($g L^{-1}$)	Rendimento de etanol Yp/s ($g_{etanol} g_{açúcar}^{-1}$)	Produtividade volumétrica Qp ($g L^{-1} h^{-1}$)	Taxa Especifica de Crescimento μx (h^{-1})
	NRRLY1214	6,2± 0,15 ^a	0,32 ± 0,03 ^a	0,069±0,002 ^a	0,11 ^a
HDOs	NRRLY7124	6,13±0,30 ^a	0,33 ± 0,02 ^a	0,068±0,003 ^a	0,084 ^a
	CBS6054	2,7± 0,30 ^b	0,16 ± 0,01 ^b	0,027±0,003 ^b	0,12 ^a
HDOcAs	NRRLY 1214	4,13 ± 0,40 ^c	0,17 ± 0,01 ^c	0,045±0,004 ^c	0,22 ^b
	NRRLY 7124	4,26 ± 0,30 ^c	0,16 ± 0,01 ^c	0,047±0,005 ^c	0,13 ^c
	CBS6054	3,0 ± 0,30 ^d	0,11 ± 0,01 ^d	0,033±0,004 ^d	0,07 ^d
HDCAs	NRRLY1214	4,8 ± 0,40 ^e	0,15 ± 0,01 ^e	0,053±0,005 ^e	0,07 ^e
	NRRLY7124	5,2 ± 0,15 ^e	0,12 ± 0,01 ^f	0,053±0,007 ^e	0,12 ^f
	CBS6054	3,6 ± 0,26 ^f	0,12 ± 0,01 ^f	0,04±0,002 ^e	0,12 ^f
HAHs	NRRLY1214	2,3 ± 0,15 ^g	0,10 ± 0,01 ^g	0,027±0,003 ^f	0,13 ^g
	NRRLY7124	2,0 ± 0,16 ^g	0,11 ± 0,001 ^g	0,017±0,001 ^f	0,13 ^g
	CBS6054	2,4± 0,15 ^g	0,11 ± 0,01 ^g	0,028±0,001 ^f	0,13 ^g

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, para o mesmo meio fermentativo não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 8 - Dados do desempenho das linhagens de leveduras de *S. stipitis* (CBS 6054, NRRLY 1214 e NRRLY 7124) frente aos hidrolisados ácidos hemicelulósicos suplementados submetidos a diferentes tratamentos de destoxificação. Parâmetros analíticos: concentração e rendimento de etanol ($\bar{Y}_p/s \text{ g}_{\text{etanol}}\text{g}_{\text{açúcar}}^{-1}$), produtividade volumétrica ($Q_p \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e taxa específica de crescimento ($\mu_x \text{ h}^{-1}$).

Linhagem de levedura	Hidrolisado Hemicelulósico	Etanol Final (g L^{-1})	Rendimento de etanol \bar{Y}_p/s ($\text{g}_{\text{etanol}} \text{g}_{\text{açúcar}}^{-1}$)	Produtividade Volumétrica Q_p ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Taxa Especifica de Crescimento μ_x (h^{-1})
NRRLY 1214	HDOs	6,2± 0,15 ^a	0,32 ± 0,03 ^a	0,069±0,002 ^a	0,11 ^{ab}
	HDOCAs	4,13 ± 0,40 ^b	0,17 ± 0,01 ^b	0,045±0,004 ^b	0,22 ^c
	HDCAs	5,2 ± 0,40 ^c	0,15 ± 0,01 ^b	0,053±0,005 ^b	0,07 ^b
	HAHs	2,3 ± 0,15 ^d	0,10 ± 0,01 ^c	0,027±0,003 ^c	0,13 ^a
NRRLY 7124	HDOs	6,13±0,30 ^e	0,33 ± 0,02 ^d	0,068±0,003 ^d	0,084 ^d
	HDOCAs	4,26 ± 0,30 ^f	0,16 ± 0,01 ^e	0,047±0,005 ^e	0,13 ^e
	HDCAs	4,8 ± 0,15 ^f	0,12 ± 0,01 ^{ef}	0,053±0,007 ^e	0,12 ^{de}
	HAHs	2,0 ± 0,16 ^g	0,11 ±0,001 ^f	0,017±0,001 ^f	0,13 ^e
CBS 6054	HDOs	2,7± 0,30 ^{hi}	0,16 ± 0,01 ^g	0,027±0,003 ^a	0,12 ^f
	HDOCAs	3,0 ± 0,30 ^{hi}	0,11 ± 0,01 ^h	0,033±0,004 ^a	0,07 ^g
	HDCAs	3,6 ±0,260 ^h	0,12 ± 0,01 ^h	0,04±0,002 ^b	0,12 ^f
	HAHs	2,4± 0,15 ⁱ	0,11 ± 0,01 ^h	0,028±0,001 ^a	0,13 ^f

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, para a mesma linhagem de levedura, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Conforme já relatado, o tratamento ácido da torta de dendê resultou em um hidrolisado (HAH) com teor de glicose abaixo de $0,65 \text{ g L}^{-1}$, mostrando assim, que o tratamento foi positivo, pois indicou não ter afetado de forma expressiva a fração celulósica da biomassa. Neste contexto os resultados do teor de glicose evidenciaram que no meio de fermentação a concentração majoritária de açúcares disponíveis para fermentação, presumivelmente, era composta, na sua grande maioria, por pentoses resultantes da hidrólise da hemicelulose. Na Figura 16, quanto ao consumo da glicose no meio de fermentação foi observado que, independente do tratamento de destoxificação, em até 16 horas de fermentação esta foi totalmente consumida. Porém, no meio de fermentação HDOCAs foi observado que, a glicose foi consumida mais rapidamente, no período de 12h, pelas três linhagens estudadas. De acordo com a literatura (LORLIAM *et al.*, 2013; CADETE *et al.*, 2012; WATANABE *et al.*, 2007) as linhagens de *S. stipitis* (*Pichia stipitis*) em meios de fermentação contendo glicose e D-xilose, preferencialmente, consomem primeiro a glicose, sendo a D-xilose consumida subsequente.

De forma geral, ao comparar a produção de etanol, $Y_{p/s}$ e os demais parâmetros no meio HAH, com e sem diluição em meio suplementado, foi possível constatar que a produção de etanol, $Y_{p/s}$, E_f e Q_p , no meio de fermentação destoxificado os quais receberam diluição, foi superior em no mínimo 86%, 63,3 %, 55,5 % e 92,7%, respectivamente. Esses dados permitem inferir que os meios de HAH da torta de dendê, empregados no processo de fermentação para as três linhagens de *S. stipitis*, quando diluídos meio MSI (10 g L^{-1} de extrato de levedura, 20 g L^{-1} de peptona, $0,47 \text{ g L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $12,8 \text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $0,51 \text{ g L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 e $0,47 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) apresentam melhores resultados no que diz respeito a produção de etanol, $Y_{p/s}$, E_f , Q_p e crescimento celular. Este fato reforça os relatos da literatura quanto à necessidade de nitrogênio, fosfato, enxofre e sais no desempenho da linhagem *S. stipitis*, evidenciando a importância da suplementação nos HAH como meio de fermentação.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo da avaliação do efeito dos processos de destoxificação por carvão ativado, *overliming* e na combinação dos dois tratamentos no desempenho de três linhagens de *Scheffersomyces stipitis* na fermentação alcoólica de hidrolisados hemicelulósicos da torta de dendê permitiram concluir que:

- ✓ O HAH da torta de dendê apresentou percentuais de compostos fenólicos, ácido acético (em maior concentração que os demais), furfural e 5-hidroximetilfurfural em sua composição.
- ✓ O tratamento de destoxificação com carvão ativado foi o mais eficiente na remoção dos compostos inibidores avaliados (furfural, 5-hidroximetilfurfural e compostos fenólicos)
- ✓ A destoxificação por *overlimng* resultou na degradação de açúcares redutores.
- ✓ As linhagens NRRLY 1214 e NRRLY 7124 foram as que apresentaram os melhores desempenhos na produção de etanol com valores correspondentes de 6,20 e 6,13 g L⁻¹ e taxas de rendimento de Yp/s 0,32 g g⁻¹ e 0,33 g g⁻¹ no meio suplementado destoxificado por *overliming* (HDOs).
- ✓ O processo de destoxificação surtiu efeito positivo quanto à produção de etanol pelas linhagens testadas nos hidrolisados com e sem diluição em meio suplementado.
- ✓ A diluição utilizando meio suplementado do meio HAH da torta de dendê resultou em significativa melhora no processo de fermentação para as três linhagens de *S. stipitis*.
- ✓ As linhagens estudadas (NRRLY 1214, NRRLY 7124 e CBS6054) boa adaptação quanto as condições de toxicidade do meio HAHns da torta de dendê.
- ✓ O uso do HAH da torta de dendê se mostrou viável como meio de fermentação para produção de etanol 2G. Toda via, são necessários maiores estudos que reflitam na melhoria das taxas de rendimento e produtividade dos processos.
- ✓ Os dados obtidos contribuirão de forma positiva no aproveitamento de resíduos agroindustriais, bem como para os avanços na área de obtenção de etanol de 2G.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATZOGLOU, N., CHORNET, E., BELKACEMI, K., 1992. Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. **Chem. Eng. Sci.** 47, 1109–1122.

AGBOGBO, FK.; COWARD-KELLY. G.; TORRY-SMITH, M. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process in Biochemistry** (2006) 41:2333-2336.

AGIRREZABAL-TELLERIA, I & GANDARIAS, P.L. ARIAS. Heterogeneous acid-catalysts for the production of furan-derived compounds (furfural and hydroxymethylfurfural) from renewable carbohydrates: A review. **Catalysis Today** 234 (2014) 42–58.

AKHLAGHI, S. GEDDE, U.W. HEDENQVIST, M.S. BRAÑA, M.T.C. BELLANDER, M. Deterioration of automotive rubbers in liquid biofuels: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** 43 (2015) 1238–1248.

ALVES, S.B. & MORAES, S.A. **Quantificação do inóculo de patógenos de insetos.** In: **ALVES, B.S. Controle Microbiano de Insetos.** Piracicaba. Ed. FEALQ, 2º ed. (1998) 765-777.

AMARTEY, S., JEFFRIES, T. An improvement in *Pichia stipitis* fermentation of acid-hydrolyses hemicellulose achieved by overliming (calcium hydroxide treatment) and strain adaptation. **World Journal of Microbiology and. Biotechnololy.** 12 (1996) 281–283.

ANDARY, J.; MAALOUY, J.; OUAINI, R.; CHEBIB, H.; RUTLEDGE, D.N.; OUAINI, N. Application of 2D correlation spectroscopy on olive stones acid hydrolysates: Effect of overliming. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 113 (2012) 58–67.

BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science** 47 (2015) 60-88.

BELLIDO, C.; BALADO, S.; COCA, M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology** 102 (2011) 78-89.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R.R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology** 101 (2010) 4767–4774.

BIODIESELBR, 2016. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/noticias/materia-prima/dende/projeto-valorizar-cadeia-productiva-dende-080115.htm>. Acesso em: 24/04/2016.

BOONSAWANG, P.; SUBKAREE, Y.; SRINORAKUTARA, T. Ethanol production from palm pressed fiber by prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation (SSF). **Biomass and Bioenergy** 40 (2012) 127-132.

BRÁS, T.; GUERRA, V.; TORRADO, I.; LOURENÇO, P.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; NEVES, L.A. Detoxification of hemicellulosic hydrolysates from extracted olive pomace by diananofiltration. **Process Biochemistry** 49 (2014) 173–180.

CADETE, R.M.; MELO, M.A.; DUSSÁN, K.J.; RODRIGUES, R.C.L.B.; SILVA, S.S., ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.; R., C.A. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermentation yeasts isolated from the Brazilian Amazonian forest. **PLOS one** (2012) v7. 1-9.

CAMESASCA, L.; RAMÍREZ, M.B.; GUIGOU, M.; FERRARI, M.D.; LAREO, C. Evaluation of dilute acid and alkaline pretreatments, enzymatic hydrolysis and fermentation of napiergrass for fuel ethanol production. **Biomass and bioenergy** 74 (2015) 193-201.

CERVERÓ, J.M.; SKOVGAARD, FELBY, P.A.; SØRENSEN, H.R.; JØRGENSEN, H. Enzymatic hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake for production of bioethanol. **Enzyme and Microbial Technology** 46 (2010) 177–184.

CHEN, H. & FU, X. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 57 (2016) 468–478.

CHI, Z.; ROVER, M.; JUN, E.; DEATON, M.; JOHNSTON, P.; BROWN, R.C.; WEN, Z.; JARBOE, L.R.. Overliming detoxification of pyrolytic sugar syrup for direct fermentation of levoglucosan to ethanol. **Bioresource Technology** 150 (2013) 220–227.

DEVENDRA, L.P. & PANDEY, A. Hydrotropic pretreatment on rice straw for bioethanol production. **Renewable Energy** (2016). <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.032>. Acesso em: 29 de março de 2016.

DÍAZ, M.J.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; MOYA, M.; CASTRO, E Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. **World J Microbiol Biotechnol** 25 (2009) 891–899.

DIONISI, D.; ANDERSON, J.A.; AULENTA, F.; MCCUEB , A.; PATON, G. The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: a review. **J Chem Technol Biotechnol** 2015; 90: 366–383.

DUANGWANG, S.; RUENGPEERAKUL, T.; CHEIRSILP, B.; YAMSAENGSUNG, R.; SANGWICHIAN, C. Pilot-scale steam explosion for xylose production from oil palm empty fruit bunches and the use of xylose for ethanol production. **Bioresource Technology** 203 (2016) 252–258.

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

FERREIRA, C.M.A. **Avaliação da torta de dendê (*elaeis guineensis*) para produção de bioetanol de segunda geração.** Dissertação (Mestrado). UFVJM. Diamantina (MG). 2013, 77p.

GAN, P.Y. & LI, Z.D., 2014. Econometric study Malaysia's palm oil position in the world market to 2035. **Renew. Sustain. Energy Rev.** 39, 740–747.

GIRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology** 101 (2010) 4775–4800.

GORDOBIL, O.; MORIANA, R.; ZHANG, L.; LABIDI, J.; SEVASTYANOVA, O. Assessment of technical lignins for uses in biofuels and biomaterials: Structure-related properties, proximate analysis and chemical modification. **Industrial Crops and Products** 83 (2016) 155–165.

GUO, G-L.; CHEN, W-H.; CHEN, W-H.; MEN, L-C.; HWANG, W-S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology** 99 (2008) 6046–6053.

GUPTA R.; MEHTA, G.; KUHAD, R.C.; Fermentation of pentose and hexose sugars from corncob, a low cost feedstock into ethanol. **Biomass and Bioenergy**. 47 (2012). 334-341.

GUPTA, A. & VERMA, J.P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 41 (2015) 550–567.

GUTIERREZ-RIVERA, B.; ORTIZ-MUNIZ, B.; GOMEZ-RODRÍGUEZ, J.; CARDENAS-CAGAL, A.; GONZALEZ, J.M.D.; AGUILAR-USCANGA, M.G. Bioethanol production from hydrolyzed sugarcane bagasse supplemented with molasses “B” in a mixed yeast culture. **Renewable Energy**. 74 (2015) 399-405.

HAHN-HAGERDAL, B., JEPSSON, H., SKOOG, K. AND PRIOR, B. A., Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb. Tech.**, 16, 933-942 (1994).

HALLOCK JR., J.L.; WU, W.; HALL, C.A.S.; JEFFERSON, M.. Forecasting the limits to the availability and diversity of global conventional oil supply: **Validation. Energy** 64 (2014) 130-153

HEIPIEPER, H.J., WEBER, F.J., SIKKEMA, J., KEWELOH, H., DE BONT, J.A.M., 1994. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends Biotechnol.** 12, 409–415.

HUANG, C.F.; LIN, T.H.; GUO, G.L.; HWANG, W.S. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology** 100 (2009) 3914–3920.

ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C.; TANTIMONGCOLWAT, T.;KONGPANPEE, T.; PRABKATE, P.; PRACHAYASITTIKUL, V. Appropriate Technology for the Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to Liquid Ethanol Future Prospects for Community Strengthening and Sustainable Development. **EXCLI Journal** 6 (2007) 167-176.

JAFARI, Y.; AMIRI, H.; KARIMI, K. Acetone pretreatment for improvement of acetone, butanol, and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Applied Energy** 168 (2016) 216–225.

JEONG, S-Y.; TRINH, L.T.P.; LEE, H-J.; LEE, J-W. Improvement of the fermentability of oxalic acid hydrolysates by detoxification using electro dialysis and adsorption. **Bioresource Technology** 152 (2014) 444–449.

JÖNSSON L.J. & MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology** 199 (2016) 103–112.

KAMAL, S.M.M.; MOHAMAD, N.L.; ABDULLAH, A.G.A.; ABDULLAH, N. Detoxification of sago trunk hydrolysate using activated charcoal for xylitol production. **Procedia Food Science** 1 (2011) 908 – 913.

KHALIL, S.R.A.; ABDELHAFEZ, A.A.; AMER, E.A.M. Evaluation of bioethanol production from juice and bagasse of some sweet sorghum varieties. **Annals of Agricultural Science** (2015) 60(2), 317–324.

KLASSON, K.T.; BRUCE S. DIEN, B.S.; HECTOR, R.E. Simultaneous detoxification, saccharification, and ethanol fermentation of weak-acid hydrolyzates. **Industrial Crops and Products** 49 (2013) 292– 298.

KOBAYASHI, T. & V. SAKAI. 1956. Hydrolysis rate of pentosan of hardwood in dilute sulfuric acid. **Bull. Agric. Chem. Soc. Japan** 20: 1-7.

KOIZUMI, T. Biofuels and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 52 (2015) 829–841.

KUHAD, R.C.; GUPTA, R.; KHASA, Y.P.; SINGH, A.; ZHANG, Y.-H.P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 15 (2011) 4950– 4962.

KUNDU, C. & LEE, J-W. Bioethanol production from detoxified hydrolysate and the characterization of oxalic acid pretreated Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) biomass. **Industrial Crops and Products** 83 (2016) 322–328.

KUNDU, C.; LEE, H-J; LEE, J-W. Enhanced bioethanol production from yellow poplar by deacetylation and oxalic acid pretreatment without detoxification. **Bioresource Technology** 178 (2015) 28–35.

KUNDU, C.; TRINH, L.T.P.; LEE, H-J.; LEE, J-W. Bioethanol production from oxalic acid-pretreated biomass and hemicellulose-rich hydrolysates via a combined detoxification process. **Fuel** 161 (2015) 129–136.

KURTZMAN, C.P. & SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience** (2010) 51:2–14.

LAM, M.K.; TAN, K. T.; LEE, K.T.; MOHAMED, A.R. Malaysian palm oil: Surviving the food versus fuel dispute for a sustainable future. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 13 (2009) 1456–1464.

LEE, J-W.; TRINH, L.T.P.; LEE, H-J.; Removal of inhibitors from a hydrolysate of lignocellulosic biomass using electrodialysis. **Separation and Purification Technology** 122 (2014) 242–247.

LI, Y.; PARK, J.; SHIROMA, R.; TOKUYASU, K. Bioethanol production from rice straw by a sequential use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* with heat inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* cells prior to xylose fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering** vol. 111 No. 6, 682–686, 2011.

LLOYD, J. B. & WHELAN, W. J. An improved method for enzymatic determination of glucose in the presence of maltose. *Anal. Biochem.* 30, 467 (1969).

LORLIAM, W.; AKARACHARANYA, A.; JINDAMORAKOT, A.; SUWANNARANGSEE, S.; TANASUPAWANT, S. Characterization of xylose-utilizing yeasts isolated from herbivore faeces in Thailand. **Science Asia** (2013): 26-35.

MARTINEZ A, RODRIGUEZ ME, YORK SW, PRESTON JF, INGRAM LO. Effects of Ca(OH)₂ treatments ('overliming') on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. **Biotechnology and Bioengy** 69 (2000) 526-536.

MATEO, S.; ROBERTO, I.C.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A.J. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. **Industrial Crops and Products** 49 (2013) 196– 203.

MBA, O.I.; DUMONT, M.; NGADI, M. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry – A review. **Food Science** 10 (2015) 26–41.

MEDINA, J.D.C.; A.W.; FILHO, A.Z.; NIGAM, P.S.; RAMOS, L.P.; SOCCOL, C.R. Steam explosion pretreatment of oil palm empty fruit bunches (EFB) using autocatalytic hydrolysis: A biorefinery approach. **Bioresource Technology** 199 (2016) 173–180.

MENON V, RAO M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals. **Progress in Energy Combust Sci** 2012;38(4):522-50.

MILLATI, R.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M.J. Effect of pH, time and temperature of *overliming* on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry** 38 (2002) 515-522.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 31 (1959) 426-428.

MODIG T, LIDEN G, TAHERZADEH MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochem Journal** 2002. 363:769-76.

MOHR, S.H.; WANG, J.; ELLEM, G.; WARD, J.; GIURCO, D. Projection of world fossil fuels by country. **Fuel** 141 (2015) 120–135.

MORANDIM-GIANNETTI, A.A.; AGNELLI, J.A.M.; LANC, B.Z.; MAGNABOSCO, R.; CASARIN, S.A.; BETTINI, S.H.P. Lignin as additive in polypropylene/coir composites: Thermal, mechanical and morphological properties. **Carbohydrate Polymers** 87 (2012) 2563– 2568.

NASIDI, M.; AGU, R.; DEENI, Y.; WALKER, G. Improved production of ethanol using bagasse from different sorghum cultivars. **Biomass and Bioenergy** 72 (2015) 288-299.

NEGAHDAR, L.; DELIDOVICH, I.; PALKOVITS, R. Aqueous-phase hydrolysis of cellulose and hemicelluloses over molecular acidic catalysts: Insights into the kinetics and reaction mechanism. **Applied Catalysis B: Environmental** 184 (2016) 285–298.

NEVES, P.V.; PITARELO, A.P.; RAMOS, L.P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and diferente fermentation Technologies. **Bioresource Technology** 208 (2016) 184–194.

PEREIRA JR., N. (1991). **Investigation of D-xylose fermenting yeast**. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry. The University of Manchester, U.K.

PIGNAL, M.C. 1967. Une nouvelle espece de levure isolee de larves d'insectes: *Pichia stipitis*. **Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon**. 36:163-168.

PRA, V.D.; SOARES, J.F. MONEGO, D.L.; VENDRUSCOLO, R.G.; FREIRE, D.M.G.; MARIA ALEXANDRI, M.; KOUTINAS, A.; WAGNER, R.; MAZUTTI, M.A.; ROSA, M.B. Extraction of bioactive compounds from palm (*Elaeis guineensis*) pressed fiber using different compressed fluids. **J. of Supercritical Fluids** 112 (2016) 51–56.

PRADO, J.M.; FORSTER-CARNEIRO, T; ROSTAGNO, M.A.; FOLLEGATTI-ROMERO, L.A.; FILHO, F.M.; MEIRELES, M.A.A. Obtaining sugars from coconut husk, defatted grape seed, and pressed palm fiber by hydrolysis with subcritical water. **J. of Supercritical Fluids** 89 (2014) 89–98.

PURWADI, R.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M.J. 2004. Kinetic study of detoxification of dilute-acid hydrolyzates by Ca(OH)₂. **J Biotechnol** 114(1-2):187-98.

RABEMANOLONTSOA, H. & SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology** 199 (2016) 83–91.

RAVINDRAN, R. & JAISWAL, A.K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology** 199 (2016) 92–102.

ROCHA, W.D.; LUZ, J.A.M.; BRUÑA-ROMERO, O. **Adsorção de cobre por carvões ativados de endocarpo de noz macadâmia e de semente de goiaba**. REM: R. Esc. Minas, Ouro Preto, 59(4): 409-414, out. dez. 2006.

RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**. Vol 454/14 August 2008. doi:10.1038/nature071.

RUIZ, HÁ.; SILVA, D.P.; RUZENE, D.S.; LIMA, L.F.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.A. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain : Effect of process conditions. **Fuel** 95 (2012) 528–536.

SAIDU, M.; YUZIR, A.; RAZMAN, M.; SALMIATI, S.; AZMAN, S.; ABDULLAH, N. Biological pre-treated oil palm mesocarp fibre with cattle manure for biogas production by anaerobic digestion during acclimatization phase. **International Biodeterioration & Biodegradation** 95 (2014) 189-194.

SAMBUSITI, C.; LICARI, A.; SOLHY, A.; ABOULKAS, A.; CACCIAGUERRA, T.; BARAKAT, A. One-Pot dry chemo-mechanical deconstruction for bioethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology** 181 (2015) 200–206.

SANTOS, M.F.R.F. **Elaboração do *technology roadmap* para biorrefinaria de produtos da lignina no Brasil** (Tese De Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2011. 309p.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy** 37 (2012) 19-27.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo, Edgard Blücher Ltda (2001) volume 2.

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

SERNA, L.V.D.; C.E. ALZATE, O.C.E.; ALZATE, C.A.C. Supercritical fluids as a green technology for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology** 199 (2016) 113–120.

SHAH, S.S.; AHMAD, I.; AHMAD, W. Adsorptive desulphurization study of liquid fuels using Tin (Sn) impregnated activated charcoal. **Journal of Hazardous Materials** 304 (2016) 205–213.

SHINOJ, S.; VISVANATHAN, R.; PANIGRAHI, S; KOCHUBABU, M. Oil palm fiber (OPF) and its composites: A review. *Industrial Crops and Products* 33 (2011) 7–22.

SHUPE, A.M. & LIU, S. Ethanol fermentation from hydrolysed hot-water Wood extracts by pentose fermenting yeasts. **Biomass and Bioenergy** 39 (2012) 31-38.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S.I, ROBERTO I. C; TEIXEIRA, J. A. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 28 (2011) 151 – 156.

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

SINDHU, R.; KUTTIRAJA, M.; PRABISHA, T.P.; BINOD, P.; SUKUMARAN, R.K; PANDEY, A. Development of a combined pretreatment and hydrolysis strategy of rice straw for the production of bioethanol and biopolymer. **Bioresour. Technol.** (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.080>

SINGHANIA, R.R.; SAINI, J.K.; REETU SAINI, ADSUL, A.; MATHUR, A.; GUPTA, R. TULI, D.K. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. **Bioresource Technology** 169 (2014) 490–495.

SINGLETON VL, ROSSI JA 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Viticult** 16: 144-158.

SUN, Z.; SHUPE, A.; LIU, T.; HU, R.; AMIDON, T.E.; LIU, S. Particle properties of sugar maple hemicellulose hydrolysate and its influence on growth and metabolic behavior of *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology** 102 (2011) 2133–2136.

TIMUNG, R.; MOHAN, M.; CHILUKOTI, B.; SASMAL, S.; Banerjee, T.; Goud, V.V. Optimization of dilute acid and hot water pretreatment of different lignocellulosic biomass: A comparative study. **Biomass and Bioenergy** 81 (2015) 9-18.

TOMEI, J. & HELLIWELL, R. Food versus fuel? Going beyond biofuels. **Land Use Policy** (2015). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.landusepol.2015.11.015>. Acesso em: 29 de março de 2016.

TOQUERO, C.& BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource Technology** 157 (2014) 68–76.

TRINH, L.T.P.; KUNDU, C.; LEE, J-W.; LEE, H-J. An integrated detoxification process with electrodialysis and adsorption from the hemicellulose hydrolysates of yellow poplars. **Bioresource Technology** 161 (2014) 280–287.

TRUMBO, J.L. & TONN, B.E. Biofuels: A sustainable choice for the United States' energy future? **Technological Forecasting & Social Change** 104 (2016) 147–161.

VINCENT, C.J.; SHAMSUDIN, R.; BAHARUDDIN, A.S. Pre-treatment of oil palm fruits: A review. **Journal of Food Engineering** 143 (2014) 123–131.

WATANABE, S.; SALEH, A.A.; PACK, S.P.; ANNALURU, N.; KODAKI, T.; MAKINO, K. (2007). Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADH-prefering xylose reductase from *Pichia stipitis*. **Mycrobiology**. 153, 3044-3054.

YADAV, K.S.; NASEERUDDIN, S.; PRASHANTHI, G.S.; SATEESH, L.; RAO, L.V. Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of

Saccharomyces cerevisiae and *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology** 102 (2011) 6473–6478.

YUCEL, H.G. & AKSU, Z. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. **Fuel** 158 (2015) 793–799.

ZAKARIA, M.R.; HIRATA, S.; HASSAN, M.A. Combined pretreatment using alkaline hydrothermal and ball milling to enhance enzymatic hydrolysis of oil palm mesocarp fiber. **Bioresource Technology** 169 (2014) 236–243.

ZAKARIA, M.R.; NORRRAHIM, M.N.F.; HIRATA, S.; HASSAN, M.A. Hydrothermal and wet disk milling pretreatment for high conversion of biosugars from oil palm mesocarp fiber. **Bioresource Technology** 181 (2015) 263–269.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **Int J Agric & Biol Eng**, 2009; 2(3): 51 – 68.

ZHUANG, X.; WANG, W.; YU, Q.; WANG, W.Q.Q., TAN, X.; ZHOU, G.; YUAN, Z. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresource Technology** 199 (2016) 68–75.

ZIOLKOWSKA, J.R. Optimizing biofuels production in an uncertain decision environment: Conventional vs. advanced Technologies. **Applied Energy**. Volume 114, February 2014, Pages 366–376.

