



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
CENTRO DE TECNOLOGIA – CTEC
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



FERNANDA KYVIA MORAES MENDONÇA

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO EM CULTURA ÚNICA DO
FUNGO ENDOFÍTICO *Botrytis sp* TENDO COMO SUBSTRATO O PAPEL FILTRO**

MACEIÓ

2020

FERNANDA KYVIA MORAES MENDONÇA

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO EM CULTURA ÚNICA DO FUNGO ENDOFÍTICO *Botrytis sp* TENDO COMO SUBSTRATO O PAPEL FILTRO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas como parte integrante dos requisitos necessários para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Profº Drº. Luiz Carlos Caetano.

Co-orientador: Profº Drº. Jorge José de Brito Silva.

MACEIÓ

2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Valter dos Santos Andrade

M539p Mendonça, Fernanda Kyvia Moraes.

Produção de etanol de segunda geração em cultura única do fungo endofítico *Botrytis sp* tendo como substrato o papel filtro / Fernanda Kyvia Moraes Mendonça, Maceió – 2020.

68 f. : il.

Orientador: Luiz Carlos Caetano.

Coorientador: Jorge José de Brito Silva

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Centro de Tecnologia, 2020.

Bibliografia: f. 58-68.

1. Etanol de segunda geração. 2. *Botrytis sp*. 3. Espectrofotométrico.
4. Bioprocesso. I. Título.

CDU: 661.725

À Deus, à toda minha família, ao meu namorado e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus pais, Marleide Mendonça e Francisco Mendonça, por todo apoio e amor, pois sem eles eu não conseguiria nada na vida;

Agradeço ao meu namorado, Sandro Sercundino, por todo incentivo e força, almejando sempre minha vitória e crescimento profissional;

Ao meu orientador, Luiz Carlos Caetano, por ter me dado à oportunidade de ser bolsista PIBITI por anos, sendo possível obter além da ajuda financeira concedida pela bolsa como também a Excelência Acadêmica em 2017, a experiência vivida no laboratório e todo conhecimento recebido;

A todos os meus amigos do laboratório de Biotecnologia de Plantas e Microrganismos Endofíticos que me apoiaram, me ensinaram e me ajudaram de alguma forma, Jéssica Rocha, Alessandre Crispim e outros que passaram por algum tempo no laboratório deixando saudades e boas memórias;

Ao meu co-orientador, Jorge José de Brito Silva, por ter aceitado ser meu co-orientador e me ajudado nesta reta final do curso, além de ter me concedido terminar os experimentos no laboratório de ensino;

A dona Margarete Cabral, técnica do laboratório de ensino de engenharia química, por ter tirado um tempo para me ajudar a realizar alguns experimentos nesta reta final;

Ao professor Carlos Eduardo (Cadu) por também ter me ajudado muito com seus conhecimentos;

A todos os meus professores da Engenharia Química, UFAL;

E finalmente à UFAL.

“Escolha uma ideia. Faça dessa ideia a sua vida. Pense nela, sonhe com ela, viva pensando nela. Deixe cérebro, músculos, nervos, todas as partes do seu corpo serem preenchidas com essa ideia. Esse é o caminho para o sucesso.”

Swami Vivekananda, pensador Hindu.

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”.

Mahatma Gandhi

RESUMO

O desenvolvimento de novas tecnologias para produção do etanol a partir da grande disponibilidade de materiais lignocelulósicos, etanol de segunda geração, é muito importante devido aos problemas climáticos que ocorrem mundialmente e ao crescimento da economia do país, mostra-se ser promissor em virtude da utilização da biomassa disponível e de baixo custo na transformação em produto energético de baixo nível de poluição ambiental. Além de poder vir a beneficiar a cadeia produtiva do etanol, com possibilidades inclusive de comercialização internacional. Visando um sistema que utiliza da biomassa disponível juntamente com microrganismos para o barateamento e simplicidade na produção de etanol de segunda geração. O fungo *Botrytis sp* mostrou-se atraente para a produção de etanol de segunda geração devido a capacidade de degradar a matéria celulósica, produzindo açúcares fermentescíveis e etanol numa única etapa de cultivo. Inicialmente, cultivou-se o fungo em meio com papel de filtro picado (20 g/L) em caldo de batata inglesa (200 g/L) (meio BP) à temperatura ambiente e a 113 rpm, para avaliar a produção de etanol em 4 semanas. No entanto, o fungo mostrou-se ter o processo de fermentação lento, produzindo baixas concentrações de etanol em condições amenas. Com o objetivo de avançar neste tema e tornar a produção de etanol de segunda geração mais eficiente, recomendou-se o estudo das condições e parâmetros de cultivos. Desta forma, foram feitas as seguintes verificações para identificar a melhor condição: necessidade de suplementação de sais no meio, sistema fechado ou semi-aberto, possibilidade de uma segunda fermentação com levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* do caldo da cultura (à 35 °C, sem agitação, fechado, por 48 h) e influência da temperatura à 35 °C, todos foram feitos em meio BP a 160 rpm por 10 dias. As análises do teor alcoólico e do açúcar redutores totais foram feitas pelos métodos espectrofotométricos. O melhor resultado foi no meio BP sem suplementação de sais, fechado, à 35 °C e 160 rpm produzindo 2,841 g/L de etanol. A possibilidade de uma segunda fermentação com a levedura foi satisfatória gerando uma concentração média máxima de 3,66 g/L de etanol a partir do caldo hidrolisado fermentado pelo *Botrytis sp* nas condições “fechado, sem sais, temperatura ambiente, 160 rpm”, contudo, o melhor rendimento fermentativo com 95,52% foi com uma segunda fermentação do hidrolisado fermentado do *Botrytis sp* na mesma condição, porém “semi-aberto”.

Palavras-Chave: Etanol de 2ª Geração, *Botrytis sp*, método espectrofotométrico, Bioprocesso Consolidado.

ABSTRACT

The development of new technologies for the production of ethanol from the great availability of lignocellulosic materials, second generation ethanol, is very important due to the climatic problems that occur worldwide and the growth of the country's economy, it shows to be promising due to the use of available and low-cost biomass in the transformation into an energy product with a low level of environmental pollution. In addition to being able to benefit the ethanol production chain, with possibilities even for international commercialization. Aiming at a system that uses the available biomass together with microorganisms for cheapness and simplicity in the production of second generation ethanol. The fungus *Botrytis sp* proved to be attractive for the production of second generation ethanol due to the ability to degrade cellulosic matter, producing fermentable sugars and ethanol in a single stage of cultivation. Initially, the fungus was grown in a medium with chopped filter paper (20 g / L) in English potato broth (200 g / L) (BP medium) at room temperature and 113 rpm, to evaluate the production of ethanol in 4 weeks. However, the fungus was shown to have a slow fermentation process, producing low concentrations of ethanol in mild conditions. In order to advance this topic and make the production of second generation ethanol more efficient, it was recommended to study the conditions and parameters of crops. In this way, the following checks were made to identify the best condition: need for supplementation of salts in the medium, closed or semi-open system, possibility of a second fermentation with commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* from the culture broth (at 35 ° C, without stirring, closed, for 48 h) and temperature influence at 35 ° C, all were done in BP medium at 160 rpm for 10 days. Analyzes of alcohol content and total reducing sugar were made using spectrophotometric methods. The best result was in the BP medium without salt supplementation, closed, at 35 ° C and 160 rpm, producing 2,841 g / L of ethanol. The possibility of a second fermentation with yeast was satisfactory, generating a maximum average concentration of 3.66 g / L of ethanol from the hydrolyzed broth fermented by *Botrytis sp* under the conditions "closed, without salts, at room temperature, 160 rpm", however, the best fermentative yield with 95.52% was with a second fermentation of the fermented hydrolyzate from *Botrytis sp* in the same condition, however "semi-open".

Keywords: 2nd Generation Ethanol, *Botrytis sp*, spectrophotometric method, Consolidated Bioprocess.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Energia e produção de etanol no Brasil.....	13
3.2 Biomassa	17
3.2.1 Biomassa Lignocelulósica	18
3.3 Processo e Produção de Etanol de Segunda Geração.....	21
3.3.1 Hidrólise enzimática	23
3.3.2 Fermentação Alcoólica	26
3.3.3 Produção de Etanol 2G	27
3.4 Fungos Filamentosos	28
3.4.1 <i>Botrytis sp</i>	29
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 Microrganismo.....	30
4.2 Preparo de Meios de Cultura	30
4.2.1 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)	30
4.2.2 Meio Líquido Batata-Papel (BP)	30
4.3 Avaliação da Evolução de Etanol no Caldo da Cultura Única do Fungo.....	31
4.3.1 Cultivo	31
4.3.2 Coleta.....	31
4.4 Avaliação da Condição/Sistema na Produção de Etanol com <i>Botrytis sp</i>	31
4.4.1 Influência de Sais e do Sistema (Semi-Aberto/Fechado) na Produção de Etanol com <i>Botrytis sp</i>	31

4.4.1.1 Avaliação da Produção de Etanol com uma Segunda Fermentação do Filtrado da Cultura com Levedura comercial	32
4.4.2 Influência da Temperatura na Produção de Etanol com <i>Botrytis sp</i>	32
4.5 Quantificação de Etanol pelo Método Espectrofotométrico	32
4.6 Quantificação de Açúcar Redutor Total (ART) pelo Método do DNS	33
4.7 Cálculos.....	34
4.7.1 Rendimento de Fermentação (RF).....	34
4.7.2 Rendimento de Hidrólise (RH).....	34
4.7.3 Produtividade de Etanol (PrE).....	35
4.7.4 Concentração de Etanol Expressa em Porcentagem Volumétrica % (v/v).....	35
4.8 Tratamento de Dados	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
5.1 Cultivo do Fungo <i>Botrytis sp</i>	37
5.2 Avaliação da Evolução de Etanol no Caldo da Cultura Única do Fungo.....	38
5.3 Avaliação dos Parâmetros da Condição/Sistema na Produção de Etanol com <i>Botrytis sp</i>.....	44
5.3.1 Influência da Suplementação de Sais e do Sistema (Semi-Aberto/Fechado) na Produção de Etanol com <i>Botrytis sp</i>	44
5.3.1.1 Avaliação da Produção de Etanol com uma Segunda Fermentação do Caldo da Cultura com Levedura comercial	52
5.3.2 Influência do Aumento da Temperatura na Produção de Etanol com <i>Botrytis sp</i>	54
6 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Desde a revolução industrial que começou no Reino Unido, aproximadamente há 250 anos, a economia mundial dependia fortemente de combustíveis fósseis como fonte de energia. Com o aumento dos preços destes combustíveis e a aflição com segurança energética, poluição ambiental e mudanças climáticas, parte-se pela busca de novos combustíveis mais sustentáveis e renováveis, os biocombustíveis (LU; SHEAHAN; FU, 2011). Os biocombustíveis são aqueles produzidos a partir da biomassa renovável.

Desta forma, o etanol vem sendo o combustível renovável mais visado para minimizar estes impactos que vêm sendo tão negativos (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007). Principalmente no Brasil, que por ser o maior produtor de cana-de-açúcar produz etanol combustível industrialmente através da fermentação de seu caldo para produzir o etanol de primeira geração, 1G (ROMERO, 2009; COSTA; SODRÉ, 2010; DELLA-BIANCA et al., 2013). No entanto, na necessidade de elevar a demanda deste álcool somado ao apelo ambiental, a comunidade científica busca aperfeiçoar e aumentar as possibilidades da sua produção. É neste contexto que surge o etanol celulósico, ou também chamado de etanol de segunda geração, 2G (LIMA; CAMARGO, 2009).

O desenvolvimento de novas tecnologias para produção do bioetanol produzido a partir da grande disponibilidade de materiais lignocelulósicos, como o bagaço e a palha da cana, a palha do trigo e do arroz, a madeira, resíduos das indústrias de polpa e papel e colheitas herbáceas, entre outros, dão vantagens para o crescimento da economia do país, na produção de etanol 2G, em virtude da utilização da biomassa disponível e de baixo custo, beneficiando a cadeia produtiva do etanol. Estes materiais são muitas vezes acumulados no ambiente gerando lixo, representando a perda de uma matéria-prima valiosa para obtenção de energias renováveis (JEFFRIES, 2006; GERAQUE, 2009, DIAS et al., 2012).

Entretanto, existem obstáculos a serem superados para a produção desse tipo de biocombustível, de mesmo modo para sua implantação no mercado, que são necessários três requisitos: a viabilidade da produção de biomassa, sem competir com culturas destinadas à alimentação, a eficiente desestruturação da parede celular vegetal e a hidrólise da celulose a baixo custo, e a otimização da fermentação dos açúcares liberados (UNITED STATES, 2006).

O bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, é constituído de celulose, hemicelulose e lignina na proporção aproximada de 50:30:20 (SILVA, 2008). A celulose é um biopolímero que se mantém coesa por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Um pequeno número de

microrganismos como fungos, bactérias e protozoários, é capaz para quebrar essas ligações (NELSON; COX, 2013).

Para a produção de etanol 2G é necessário um pré-tratamento para separação dos biopolímeros, como hemicelulose e lignina, aumentando a acessibilidade à celulose, para a etapa posterior (NASCIMENTO, 2011). Conjuntamente a etapa de pré-tratamento há também as etapas de hidrólise da celulose à glicose, fermentação do caldo hidrolítico e destilação do vinho fermentado. A hidrólise pode ser catalisada por ácido ou enzimas celulolíticas, sendo esta última mais promissora por possuir certas vantagens em relação à hidrólise ácida (NGUYEN, 1993).

Há várias configurações para o processamento na produção de etanol 2G. Um deles é o Bioprocesso Consolidado (BCP). Este processo utiliza simultaneamente as etapas: produção de enzimas, a hidrólise enzimática da celulose e fermentação, sendo feitas numa única etapa por um mesmo microrganismo (SANTOS, 2012).

Os fungos são organismos eucarióticos, cosmopolitas e heterotróficos que desempenham um papel fundamental na decomposição de matéria orgânica (MAIA; CARVALHO, 2010). A forma de digestão é por absorção, absorvem os nutrientes ao invés de digerir-los, secretando enzimas para hidrolisar polissacarídeos, lipídeos e proteínas, quebrando-os em compostos menores e permitindo a transferência destes nutrientes para o interior da célula e, portanto, destacam-se por serem capazes de metabolizar carboidratos complexos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Diante deste contexto, será realizado o estudo da produção de etanol de 2ª Geração através da cultura única do fungo *Botrytis sp*, onde este irá atingir as etapas de hidrólise e fermentação do substrato sólido, papel filtro, sendo a principal fonte de carbono no meio, numa única etapa. Além disso, será verificada a capacidade produtiva de etanol através da sua quantificação produzida no caldo da cultura do *Botrytis sp* pelo método espectrofotométrico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a possibilidade de produção de etanol de segunda geração no bioprocesso consolidado das culturas do fungo endofítico *Botrytis sp* tendo como substrato papel filtro.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento do fungo, em meio BDA (Batata Dextrose e Agar) e BP (Batata Papel), e a produção de etanol no caldo da cultura do *Botrytis sp* à temperatura ambiente e baixa rotação orbital (113 rpm) através da quantificação do teor alcoólico pelo método espectrofotométrico;
- Identificar os parâmetros/condições de cultivo do *Botrytis sp* que favoreça a maior produção de etanol estudando a influência dos seguintes quesitos: suplementação de sais, oxigenação através do cultivo em sistemas semi-aberto e fechado, e da temperatura;
- Avaliar a possibilidade de uma segunda fermentação do caldo da cultura do *Botrytis sp* com levedura comercial e identificar os parâmetros/condições de cultivo que favoreça a maior produção de etanol, em termos de rendimento e concentração.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Energia e produção de etanol no Brasil

Um dos critérios que revelam o desenvolvimento econômico e o nível de qualidade de vida de um país é a quantidade de energia que ele consome. Esse consumo está relacionado tanto no progresso de atividade dos setores industrial, comercial e de serviços, quanto na capacidade da população para adquirir bens e serviços tecnologicamente mais avançados. Sendo desta forma o principal motivo para o crescimento do consumo mundial de energia.

Assim, a capacidade energética tem grande importância no desenvolvimento econômico do país. Segundo Sene e Moreira (2010, p. 239)

O setor energético é considerado estratégico e quase sempre é controlado pelo estado através de políticas de planejamento da produção, concessão de exploração a grupos privados ou intervenção direta na produção através de empresas estatais. A estrutura energética insere-se diretamente na economia e na geopolítica: produção industrial, sistema de transporte, segurança, saúde, educação, lazer, comércio, agricultura. Qualquer colapso na produção ou elevação de seus custos afeta o cotidiano de todas as atividades desenvolvidas no país, na posição da nação no comércio internacional, na composição dos custos de produção e na competitividade da empresa e do país.

Contudo, a matriz energética mundial ainda é vigorosamente focada para as fontes de energia fósseis, não renováveis, com participação total de 80%, sendo 36% de petróleo, 23% de carvão mineral e 21% de gás natural. Estudos mostram que o esgotamento dessas fontes de energia de origem fóssil é para as próximas quatro a cinco décadas, evidenciando a urgência de buscar outras fontes alternativas de energia (EMBRAPA, 2006).

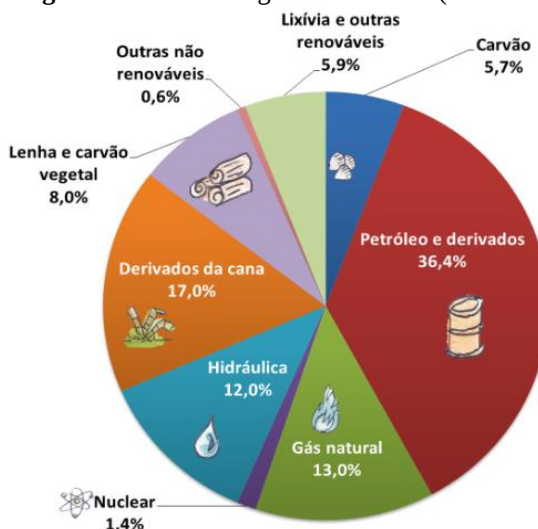
Além disso, segundo Pinto et al. (2007) o preço do barril de petróleo comporta-se de maneira muito instável quando se faz um estudo matemático calculando a média e o desvio padrão do intervalo temporal de 1990 até 2016 (valores corrigidos a preços de 2016), verifica-se que a média é de US\$56,58 com desvio padrão de 32,30 US\$, considerado um desvio muito alto.

É nesse contexto que coloca os países em situação de vulnerabilidade estratégica, devido à possibilidade de esgotamento desses recursos, a oscilação dos preços nos mercados internacionais e os seus derivados; e por ainda serem um dos grandes responsáveis pelo aquecimento global e seus desdobramentos.

Em compensação o Brasil é muito diferente do mundo referente à sua matriz energética, observa-se na Figura 1 que das fontes fósseis utiliza-se 55,1%, e das fontes renováveis ele consome mais do que o resto do mundo, totalizando 42,9% de renováveis na

matriz energética brasileira, sendo a biomassa da cana-de-açúcar corresponde a 17%, podendo ser utilizadas para o aumento da quantidade de energia no país.

Figura 1: Matriz Energética Brasileira (Ano base 2017).



Fonte: EPE, 2018.

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, sendo o segundo produtor mundial de açúcar, perdendo apenas para a Índia (SEVERO, 2006). É a partir da cana que se obtém além do açúcar os subprodutos como o álcool, o vinhoto e o bagaço, deste último produz centenas de toneladas de resíduos lignocelulósicos, como também a produção de calor e energia elétrica a partir da queima. A utilização do etanol como biocombustível associado à possibilidade de uso como fonte energética desenvolvida com tecnologia brasileira tem vantagens comparativas na produção e pode criar vantagens competitivas com as de combustíveis fósseis que cogita a escassez destes produtos, além dos aspectos ambientais decorrentes (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

Diante das crises de petróleo, como a de 1929 (queda da bolsa de Nova York), o álcool, como subproduto da agroindústria da cana-de-açúcar, ganhou mercado a partir de 1931, por intermédio do decreto nº 19.717/1931 com a obrigatoriedade de acréscimo de 5% de álcool anidro à gasolina para os veículos e em 1933, com a criação do Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA) que tinha a responsabilidade de estabelecer preços, cotas de produção por usina e percentual de mistura com o propósito de resolver os problemas de excesso de oferta e de reorganizar os mercados internos (BNDES; CGEE, 2008).

Na década de 70, lança-se o Programa Nacional do Alcool (Proálcool) utilizado na qualidade de medidas de incentivo para a produção de álcool etílico na substituição de derivados de petróleo no setor automotivo mediante o uso como combustível único nos

veículos movidos à álcool hidratado ou utilizado como aditivo à gasolina (álcool anidro) (MME, 2007). Então, em 1978, o etanol deixou de ser efetivamente um subproduto da produção de açúcar para ser usado principalmente nos carros movidos a etanol hidratado (E100) (PISSINATO, 2014). Devido à alta do preço do petróleo e do crescimento da conscientização ambiental, lançou-se, em 2003, os veículos “flex-fuel”, em atendimento ao acordo internacional que prioriza a redução das emissões de gases do efeito estufa liberados pelos países industrializados objetivando um modelo de desenvolvimento limpo aos países em desenvolvimento (Protocolo de Kyoto) (GODOY, 2005).

Outras ações governamentais foram propostas para incentivar a produção e a valorização das fontes renováveis, em especial do etanol, como os aumentos das adições do percentual do álcool anidro a gasolina de 25% para 27%, desde março de 2015 (MAPA, 2015) e o RenovaBio que é a Política Nacional de Biocombustíveis, estabelecida em 2017 com o objetivo de estabelecer metas nacionais anuais para redução de emissões de carbono, através de créditos de descarbonização no setor de combustíveis com o intuito de incentivar o aumento da produção e da participação dos biocombustíveis (ANP, 2020).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, atrás dos Estados Unidos, sendo este último feito através do milho (VEROTTI, 2020). A partir da Tabela 1, identifica-se vantagens do etanol do Brasil em relação ao do EUA e ao da Europa, observa-se que o custo de etanol fabricado da cana brasileira equivale a aproximadamente a metade do custo produzido do milho norte-americano e quase um terço do produzido da beterraba na Europa. Como também a redução de CO₂ em relação à gasolina; para o etanol proveniente da cana uma redução de 84%, mais que o dobro do etanol do milho ou da beterraba. Sem mencionar o rendimento do etanol brasileiro que é maior.

Tabela 1: Características de diversas culturas para produção de etanol.

	Cana (Brasil)	Milho (EUA)	Beterraba (Europa)
Balanço energético	8.1-10	1.4	2.0
Custo de Produção (€/100litros)	14.48	24.83	52.37
Redução de CO ₂ em relação à gasolina	84%	30%	40%
Produção Total (bilhões de litros)	22.5	34	2.7
Área Plantada (milhões de hectares)	3.4	8.13	0.49
Rendimento (litros/hectares)	6471	4182	5500

Fonte: UNICA, 2009.

No geral, o etanol apresenta três finalidades de utilização: como combustível, como insumo em processos industriais e para fabricação de bebidas. Na utilização como combustível ele possui qualidades que possibilitam uma combustão mais limpa por ter elevado teor de oxigênio (em torno de 35% em massa do etanol) e melhor atividade nos motores, colaborando para redução das emissões dos gases do efeito estufa (GEE), igualmente quando misturado à gasolina (BNDES; CGEE, 2008).

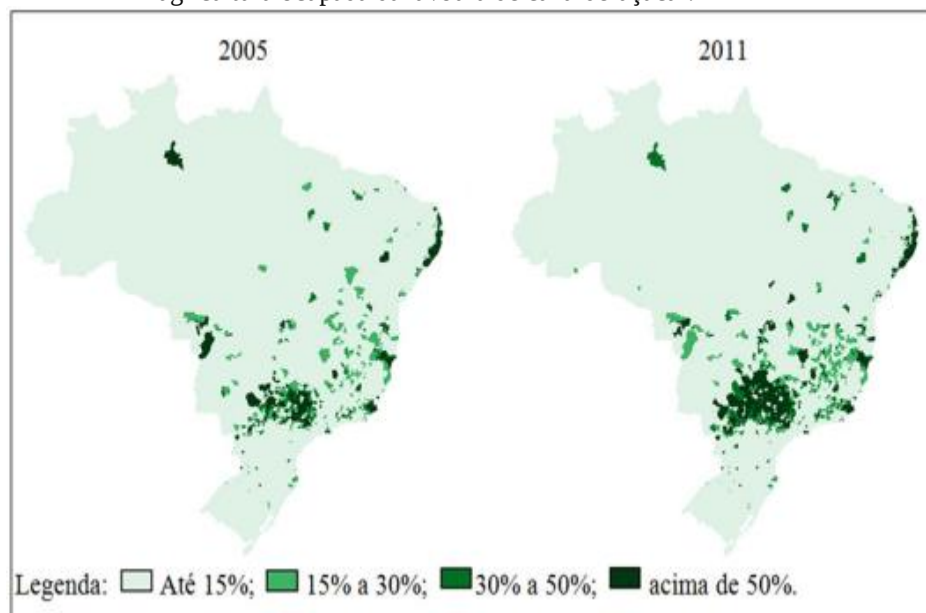
O biocombustível mais consumido é o etanol sendo sua produção é a que mais eleva no mundo, com um crescimento de 4,4 bilhões de barris em 1980 para 46,2 bilhões de barris em 2005 (MURRAY, 2005). De acordo com a Tabela 2, o mercado de etanol crescerá ainda mais, em razão disso, novas tecnologias surgem na busca de aumentar ainda mais a produtividade deste, sem aumentar o seu custo e de forma que sua fabricação não haja competitividade sobre culturas agrícolas para produção de alimentos, o que seria impactante. É o que pode ser observado na Figura 2, o aumento concentrado das lavouras de cana-de-açúcar principalmente nas regiões Sudeste, Centro-oeste e alguns estados do Nordeste. Os choques de interesse com a produção de gêneros alimentícios podem ser impedidos pelo crescimento da produtividade e não pela expansão da área cultivada.

Tabela 2: Perspectivas para a produção do setor sucroalcooleiro no Brasil.

Safras	2008/09	2015/16	2020/21
Produção cana-de-açúcar (milhões t)	562	829	1.038
Açúcar (milhões t)	31,2	41,3	45
Consumo interno	10,2	11,4	12,1
Exportação	21,0	29,9	32,9
Etanol (bilhões litros)	27,0	46,9	65,3
Consumo interno	22,2	34,6	49,6
Excedente para exportação	4,8	12,3	15,7
Potencial bioeletricidade (MWmédio)	1.800	8.158	13.158
Participação na matriz elétrica brasileira (%)	3%	11%	14%

Fonte: SILVESTREIN, 2009.

Figura 2: Expansão da cultura canavieira nos estados brasileiros: percentual de área destinada à agricultura ocupada da lavoura de cana-de-açúcar.



Fonte: GILIO, 2015.

Com a finalidade de aumentar a produção de etanol para atender a demanda mundial, vem sendo debatida, como fonte alternativa e complementar, a conversão dos compostos lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis para produzir o etanol. Denomina-se etanol de primeira geração o etanol da cana-de-açúcar, obtido por meio da fermentação alcoólica da sacarose, como também o etanol que foi produzido a partir do amido. Enquanto que o etanol de segunda geração é aquele obtido a partir dos polissacarídeos da parede celular vegetal. Tem-se falado no de terceira e de quarta geração, nos quais utilizam a modificação genética (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010).

Existe uma grande variedade de material lignocelulósico que pode servir como substrato na produção do etanol 2G, entretanto o procedimento até então apresenta obstáculos econômicos, especialmente devido ao preço alto das enzimas utilizadas (LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014).

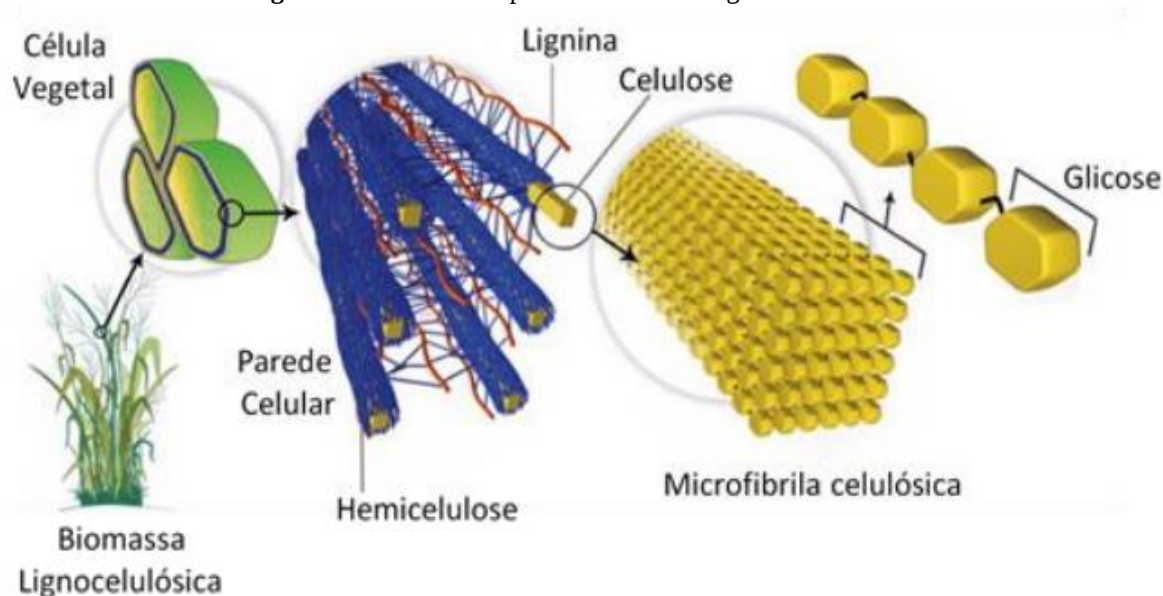
3.2 Biomassa

No geral, biomassa é toda massa biológica renovável derivada de matéria orgânica podendo ser utilizada na produção de energia, é considerada uma forma indireta de energia solar (ANEEL, 2009).

3.2.1 Biomassa Lignocelulósica

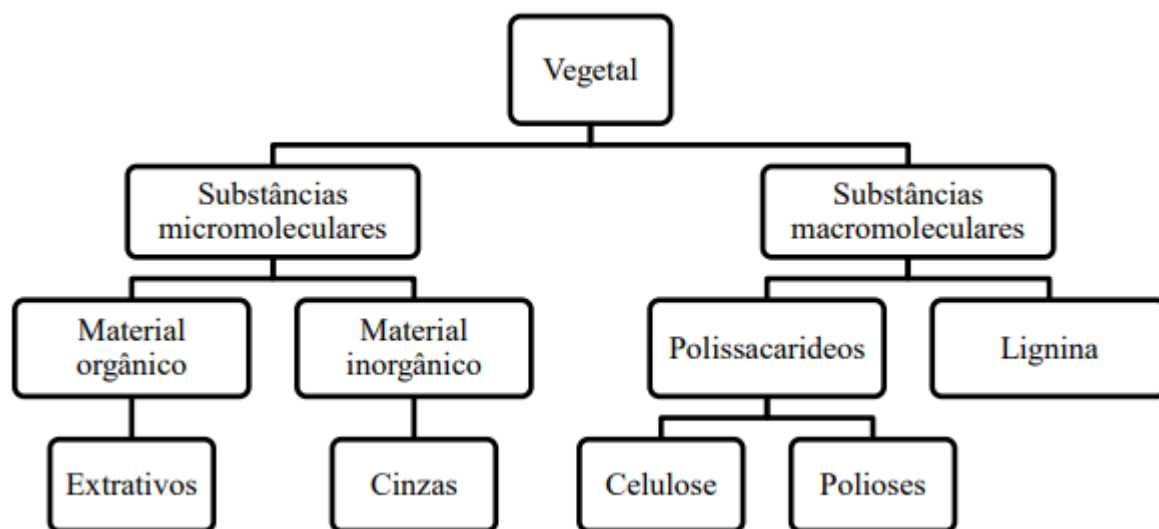
A biomassa lignocelulósica é o recurso biológico mais abundante da terra e é formada por três componentes, a celulose, hemicelulose e lignina, que fazem parte da parede celular das plantas (PAULY; KEEGSTRA, 2008). Esta matéria-prima é promissora pois oferece vantagens pelo seu excesso no mundo e de baixo custo no cenário da produção do bioetanol (BROWN et al., 2017). Observa-se na Figura 3 a estrutura da biomassa lignocelulósica composta por fibras vegetais que são constituídas por fibrilas de celulose mantidas juntas por uma matriz formada por lignina e hemicelulose servindo como uma barreira natural contra a degradação de microrganismos e de proteção mecânica (SILVA et al., 2009).

Figura 3: Estrutura complexa da biomassa lignocelulósica.



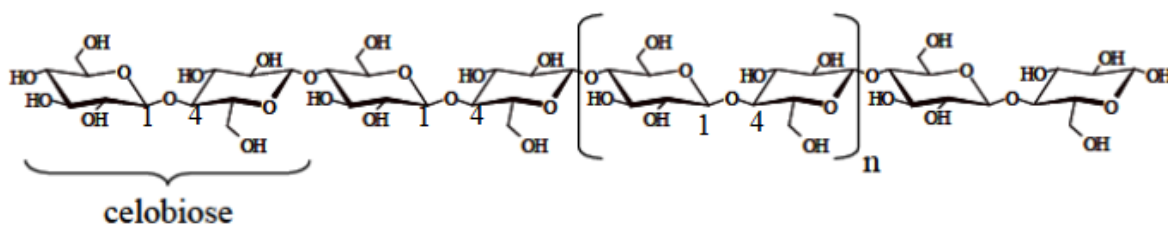
Fonte: Adaptado de MOTA et al. , 2015.

Pode-se notar (Figura 3) que o acesso às moléculas de glicose da celulose é dificultado devido ao emaranhado feito por lignina e hemicelulose a sua camada externa. E na Figura 4 mostra-se um esquema geral dos componentes químicos contidos nos vegetais.

Figura 4: Esquema geral dos componentes químicos presentes nos vegetais.

Fonte: Adaptado de FENGEL; WEGENER, 1989.

A celulose (Figura 5) é um biopolímero formado por vários elementos de celobiose repetidos, e este é constituído por duas moléculas de glicoses ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas. As moléculas de celulose são montadas em unidades maiores constituindo as fibrilas elementares, que são empacotadas em unidades maiores chamadas microfibrilas que por sua vez formam a fibra celulósica (Figura 3) (FENGEL; WEGENER, 1989). Ela tem fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$, sendo que n tem no mínimo valor $n=200$ a sua grande cadeia polimérica com repetidas unidades de β -glucose e o seu percentual de alfa celulose é, em peso, de C 44,4%, O 49,4% e H 6,2% (KHEZAMI et al., 2005).

Figura 5: Cadeia linear da celulose sendo formada por unidades de celobiose.

Fonte: Adaptado de TÍMÁR-BALÁZSY; EASTOP, 1998.

Geralmente, a quantidade da biomassa em relação à celulose varia de 35-50%, hemicelulose de 20-35% e lignina de 10-25%, além de uma pequena quantidade de cinzas e extrativos (SANTOS et al., 2012). Na Tabela 3 mostra a composição de alguns materiais lignocelulósicos, de modo que na maioria dos materiais a celulose apresenta em maior quantidade comparada a hemicelulose e lignina.

Tabela 3: Percentual de celulose, hemicelulose e lignina de alguns resíduos agrícolas.

Material Lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Caules folhosos	40-55	24-40	18-25
Casca de nozes	25-30	25-30	30-40
Espiga de milho	45	35	15
Gramíneas	25-40	35-50	10-30
Papel	85-99	0	0-15
Palha de trigo	30	50	15
Lixo sortido	60	20	20
Sementes de algodão	15-20	80-85	0
Jornal	80-95	5-20	0
Capim Bermuda	25	35.7	6.4
Muda de grama	45	31.4	12.0
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Algodão	95	2	0,3
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

Fonte: Adaptado de SUN; CHENG, 2002; ROCHA et al., 2011; SANTOS et al., 2012.

No Brasil, apenas 37% do papel produzido é reciclado, sendo que 80% é designado para a confecção de embalagens, 18% para papéis sanitários e somente 2% para impressão. Onde para cada tonelada de papel, são necessárias 2 toneladas de madeira (equivalente a 15 árvores), 44000 a 100000 litros de água, 5 a 7600 mil KW de energia e gerando, em volume de lixo 18 kg de poluentes orgânicos descartados nos efluentes e 88 kg de resíduos sólidos de difícil degradação (RECICLASAMPA, 2018).

Desta forma, os resíduos agroindustriais como palha do trigo e da cana-de-açúcar, cascas, resíduos florestais e resíduos urbanos como papeis e entre outros, que são tradicionalmente queimados ou descartados, podem servir de matérias-primas para produção do bioetanol.

Em vista disso, diversos processos estão sendo desenvolvidos para utilização desses materiais, visto que o acúmulo desses resíduos, que cresce a cada ano, causa prejuízo ao meio

ambiente e a perda de recursos. Esses materiais estão sendo convertidos em produtos químicos e com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. Assim sendo, o bioprocessamento destes resíduos agroindustriais é uma alternativa racional para obter produtos de alto valor agregado e uma contribuição para solucionar o problema da poluição ambiental (PANDEY et al., 2000).

O etanol pode ser obtido por qualquer um destes resíduos que tenha glicose ou outro carboidrato constituinte. No entanto, para que seja viável economicamente, é preciso considerar seu volume de produção, o rendimento industrial e o custo de obtenção (LIMA et al., 2001). Devido à conformação estrutural (Figura 3), as diferentes proporções entre celulose, hemicelulose e lignina (Tabela 3), como também sua composição química em materiais lignocelulolíticos distintos, estão relacionados diretamente aos custos de produção para se obter o bioetanol com um bom rendimento do processo.

3.3 Processo e Produção de Etanol de Segunda Geração

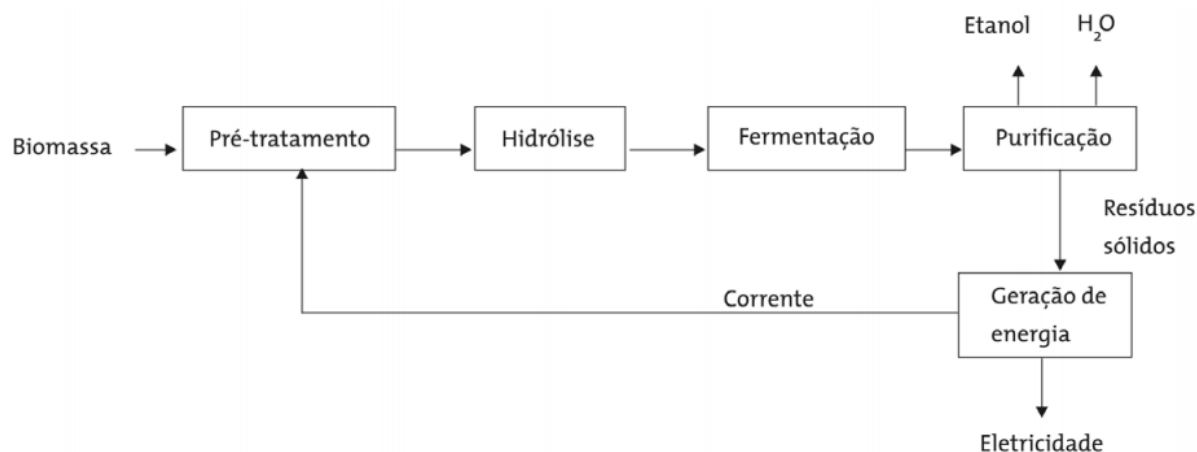
A ideia de produzir etanol a partir de biomassa lignocelulósica não é de hoje, em 1819 publicou-se a proposta de extrair álcool a partir de madeira, por via de hidrólise e fermentação. Em 1894 foi realizado um tratamento com ácidos a alta pressão em serragem, trouxe rendimento de 7,5 a 9 litros de álcool a cada 100 kg de madeira seca. Em 1910, instalou-se, na América do Norte, a produção de álcool a partir de serragem de pinus. No Brasil, os estudos sobre etanol 2G iniciaram em 1970 contando com a implementação de uma usina experimental em Uberlândia, produzindo 30 mil L/dia, a qual utilizava a floresta de eucalipto como matéria-prima. Porém, o processo não foi satisfatório (SILVA, 2012).

Diversas barreiras têm surgido para a implementação em escala industrial do etanol 2G no que se refere à viabilidade econômica. Entretanto, vem sendo realizados diversos estudos com a finalidade de encontrar caminhos economicamente mais desejáveis para o uso de resíduos lignocelulósicos na produção do bioetanol.

Segundo Soares e Rossell (2007) os custos de produção de biomassa no Brasil são os menores do mundo, destacando a possibilidade de resultados satisfatórios. Por outro lado, a perspectiva é de que a produção de etanol lignocelulósico aumente em até 50% a produção de álcool e sem necessitar expandir as plantações. A produção de etanol de segunda geração é viável relacionando a demanda do mercado e o desenvolvimento das tecnologias de produção de etanol, a partir da biomassa.

No geral, a produção de etanol de segunda geração engloba quatro principais etapas: pré-tratamento da biomassa, hidrólise com produção de açúcares fermentescíveis, fermentação dos açúcares e, por fim, a separação do produto por destilação (ARAÚJO et al., 2013) como mostra na Figura 6.

Figura 6: Processo geral para obtenção de etanol da biomassa.



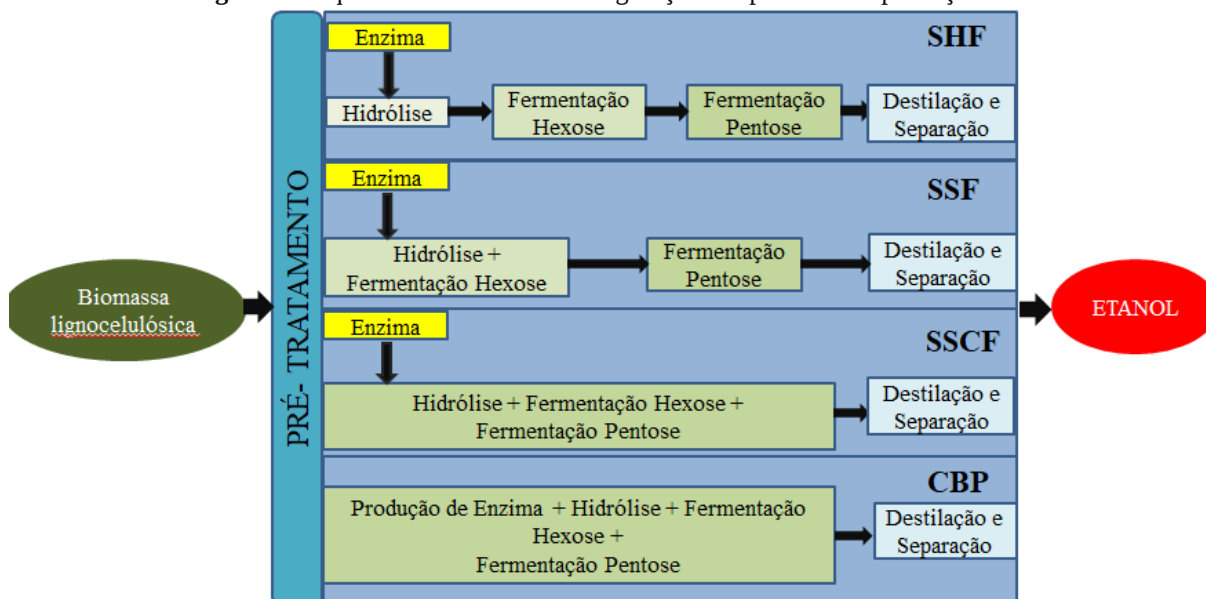
Fonte: HAMELINCK; HOOIJDONK; FAALJ, 2005.

Existem vários tipos de pré-tratamentos e os métodos são divididos em diferentes categorias: físicos (moagem e trituração), físico-químicos (Pré-tratamento a vapor/auto-hidrólise, hidrotérmicos e oxidação úmida), químicos (alcalino, ácido diluído, os agentes oxidantes, e solventes orgânicos), biológicos que degrada a lignina e hemicelulose com baixa energia requerida, porém a taxa de hidrólise é pequena e a velocidade é baixa, ou uma combinação destes (SARKAR, 2012). Nos pré-tratamentos biológicos envolvem a deterioração fúngica chamadas de fungos da podridão da madeira e da podridão branca nos quais recebem grande importância na degradação das linoceluloses (SUN et al., 2016). Neste tipo de pré-tratamento é muito vantajoso para as indústrias pelo alto grau de especificidade desta degradação, o que previne a produção de substâncias tóxicas e inibitórias das etapas de hidrólise ou fermentação (BRONZATO, 2016). O pré-tratamento é uma das etapas mais caras no processo de conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis, visto que necessita do uso de vapores e produtos químicos, e portanto a exigência de reatores resistentes à corrosão (LASER et al., 2002). Devido ao substrato utilizado neste trabalho ser composto apenas de celulose, este processo de pré-tratamento não irá ser focado.

Há diferentes configurações de processos que podem ser definidas com base nesses eventos para produção de etanol de segunda geração: hidrólise separada da fermentação

(SHF), a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), a sacarificação e cofermentação simultânea (SSCF) e o bioprocesso consolidado (BCP), essas estratégias estão resumidas na Figura 7.

Figura 7: Esquema das diferentes configurações de processo de produção de etanol 2G.



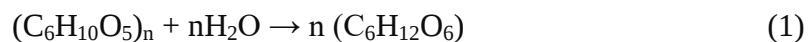
Fonte: Adaptado de HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005.

Especificamente ao Bioprocesso Consolidado (BCP) ocorre todas as etapas: a hidrólise do material hemicelulósico (pré-tratamento), a hidrólise da celulose em si e a fermentação. Para essa finalidade, necessitam-se do auxílio da tecnologia e da engenharia genética para o desenvolvimento de microrganismos capazes de realizar todas essas etapas (VÁSQUEZ, 2007). O BCP tenta associar uma redução de custos operacional, em meio à simplificação de processos e a eliminação do uso de enzimas (que encarecem o processo), pois as enzimas celulases são produzidas pelos mesmos microrganismos que fermentam os açúcares, convertendo-os em etanol (MARQUES, 2009). Além disso, o custo de conversão pode ser reduzido de 18,90 US \$ / gal, na configuração SSCF, para 4,23 US \$ / gal com a estratégia CBP (LYND et al., 2005).

3.3.1 Hidrólise enzimática

Define-se sendo uma reação de hidrólise a quebra de uma ligação química com a adição de uma molécula de água nas estruturas restantes, podendo ser química ou enzimática.

A etapa da hidrólise é responsável pela quebra do biopolímero de celulose em monômeros de glicoses, conforme a Reação 1. Esse processo pode ser catalisado por três tipos: hidrólise ácida concentrada, hidrólise ácida diluída e hidrólise enzimática (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAALJ, 2005).



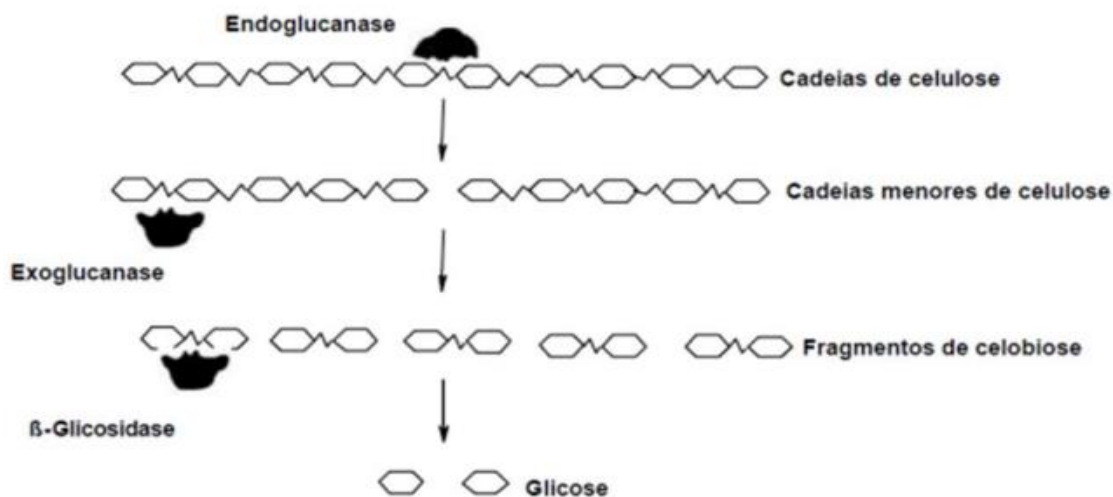
Na utilização de ácidos concentrados vem sendo operados o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido clorídrico (HCl) para tratar materiais lignocelulósicos. Apesar de eles serem poderosos agentes de hidrólise da celulose, os ácidos concentrados são tóxicos, corrosivos e perigosos e requerem reatores resistentes à corrosão, e ainda necessitam ser recuperados, após hidrólise, para tornar o processo economicamente viável (SIVERS; ZACCHI, 1995; YE SUN, 2002). Devido a esses fatores o processo com ácidos concentrados eleva o custo do produto final com o uso dos equipamentos resistentes, ácido e sua recuperação.

Com ácidos diluídos o mais comum utilizado é o H_2SO_4 , em virtude do seu menor preço e dos poucos problemas com corrosão. As concentrações baixas de ácido (<1%) necessitam de altas temperaturas (180-230°C) com o objetivo de alcançar taxas de reações permissíveis na hidrólise da celulose e obter altos rendimentos de glicose. No entanto, os carboidratos da hemicelulose, as pentoses e em menor extensão as hexoses, são rapidamente degradados em altas temperaturas. Como também há formação de produtos da degradação que pode inibir a fermentação, a hidrólise com ácido diluído é dividida em duas etapas. Na primeira etapa, a hemicelulose é hidrolisada em condições amenas com temperaturas entre 170-190°C, e concentrações do ácido entre 0,5-1,2% (m/m). Na segunda etapa os sólidos restantes são removidos e tratados com temperaturas por volta de 200-230°C e com concentrações maiores de ácido (até 2,5% m/m). O resultado disso é um rendimento total teórico de 50-60% para a glicose e próximo de 90% para açúcares da hemicelulose (OGEDA; PETRI, 2010).

Enquanto que especificamente na hidrólise enzimática é o processo bioquímico que degrada a celulose, hidrolisada na etapa de pré-tratamento, em glicose que será posteriormente fermentada. Esta conversão enzimática é realizada por um complexo enzimático, a celulase, constituída por pelo menos três classes principais que atuam sinergeticamente sobre a celulose, são as endoglucanases (endo-1,4-β-D-glucanases), as quais quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose gerando novos terminais (ataca regiões de baixa cristalinidade na fibra); as Celobio-hidrolases (exo-1,4-β-D-glucanases), as

quais são responsáveis pela ação nos terminais, resultando em celobiose, e por fim, as β -glicosidases (1,4- β -D-glicosidases), que convertem as moléculas de celobiose em duas moléculas de glicose, a fim de eliminar a inibição da atividade das celulases pelo acúmulo de celobiose (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; OGEDA; PETRI, 2010). Como mostra na Figura 8 representada de forma simplificada a ação enzimática de cada classe de enzimas.

Figura 8: Atuação do complexo enzimático: celulase



Fonte: ZANCHETTA, 2013

Este complexo celulolítico atua em sinergia, ou seja, o produto de uma é o substrato da outra, apresentando um melhor rendimento a partir de uma combinação de enzimas. São conhecidas três formas de sinergia que torna o mecanismo complexo e instável:

- Sinergia EnG-ExG (endoglucanase/exoglucanase);
- Sinergia ExG-ExG (exoglucanases);
- Sinergia ExG-BG e EnG-BG (exoglucanase/ β -glicosidase e endoglucanase/ β -glicosidase) (CARVALHO, 2011; CASTRO; PEREIRA, 2010).

Em relação a vantagens, a hidrólise enzimática é mais vantajosa que a hidrólise ácida, devido as condições de reação serem mais brandas de pH, temperatura e pressão. Como também, a alta especificidade das enzimas limita a formação de produtos tóxicos ao processo fermentativo. Em contrapartida, a hidrólise enzimática tem uma grande desvantagem, custo das enzimas que pode inviabilizar economicamente o processo de produção de etanol (CASTRO; PEREIRA, 2010; RANA et al., 2014).

Outro problema deste agrupamento enzimático é que as enzimas são inibidas pelos seus próprios produtos, à medida que as concentrações de glicose e celobiose aumentam a atividade da celulase é inibida (SUN; CHENG, 2002).

Com o propósito de evitar influências na ação do complexo enzimático deve-se levar com grande importância algumas características estruturais da celulose como a cristalinidade, o grau de polimerização e a acessibilidade. A reatividade do substrato pode ser estimada pela quantificação das partes cristalinas que tem a celulose, em virtude de que a hidrólise enzimática é de 3 a 30 vezes mais rápida em celulose amorfa do que em celulose cristalina. Dessa maneira, a hidrólise enzimática será mais rápida quanto menor for a cristalinidade da celulose (CARVALHO, 2011; MAEDA et al., 2011).

É indispensável ressaltar que a hidrólise enzimática observada (Figura 8) refere-se à hidrólise da celulose apenas, em razão de que a hidrólise da hemicelulose até então é amplamente conhecida e verifica-se em conjunto com a separação da lignina (hidrólise química). Entretanto, não conhece até o momento, micro-organismos capazes de fermentar as pentoses, produto da hidrólise das hemiceluloses, em escala industrial. Enquanto que ocorre o oposto para as celuloses: a hidrólise é muito difícil, em contrapartida a fermentação de seu produto, as hexoses, está bem divulgada há milênios. Essa discordância no processamento da biomassa lignocelulósica representa um dos grandes obstáculos à sua utilização como fonte de etanol (ROSA; GARCIA, 2009). Além disso, o sistema enzimático para a hidrólise da hemicelulose é mais complexa que o sistema para a celulose, visto que a hemicelulose possui natureza heterogênea.

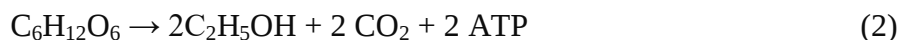
3.3.2 Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo metabólico dos microorganismos na produção de etanol, algumas bactérias e leveduras transformam anaerobicamente o açúcar em etanol e dióxido de carbono (ZAMORA, 2009; ZABED et al., 2017).

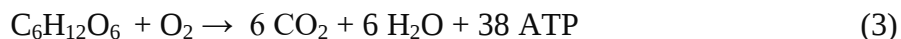
Para a produção do etanol de primeira geração, produzido a partir de biomassas sacarídeas e amiláceas, o seu principal açúcar disponível para fermentação nesses materiais é a glicose. Enquanto que os açúcares provenientes de hidrolisados lignocelulósicos para a produção de etanol de segunda geração possuem uma mistura de hexoses e pentoses (ZABED et al., 2017).

No processo de fermentação, descrito na Reação 2, a reação geral após a etapa de glicólise, em condições anaeróbicas, o piruvato é reduzido posteriormente a etanol com a liberação de uma molécula de gás carbônico. O rendimento teórico deste processo é 0,511 g de etanol/1 g de glicose e 0,489 g de gás carbônico/1g de glicose. Os dois ATPs produzidos na glicólise são utilizados para direcionar a biossíntese de macromoléculas, envolvendo uma grande variedade de reações que necessita de energia. O metabolismo da glicose é interrompido caso não haja o consumo contínuo de ATPs pelas células em crescimento, isto porque, uma das enzimas mais importantes envolvidas na regulação da glicólise, fosfofrutoquinase (PFK), é inibida pelo acúmulo intracelular de ATP (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

A partir da glicose o microrganismo inicia seu metabolismo de acordo com as condições do meio produzindo etanol e CO₂ em condições anaeróbicas:



Em condições de aerobiose o microrganismo faz respiração, de acordo com a Reação 3, geral da respiração:



O microrganismo mais usado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e ela é usada na produção industrial tanto em bebidas alcoólicas quanto no álcool combustível devido à sua capacidade fermentativa (VENTURINI, 2005).

3.3.3 Produção de Etanol 2G

No trabalho de Alencar e Gouveia (2015), na produção de etanol de hidrolisado enzimático de papel de escritório descartado, utilizando uma carga de 5 % m/V para submeter ao pré-tratamento com ácido sulfúrico (1% V/V), a 50°C e 150 rpm, durante 3 horas, após hidrolisado com a enzima (Novozyme - Celluclast 1,5L; 7 FPU/mL) a 50°C e 150 rpm, durante 72 horas e depois fermentado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* à 37°C e 80 rpm, durante 48 horas, produziu 14 g/L de etanol com rendimento de 42% (m/m).

Na dissertação de Pereira (2013) na produção de etanol utilizando biomassas pré-tratadas, com ácido sulfúrico, de capim-elefante, capim-mombaça, capim-andropogon submetendo à hidrólise enzimática com celulasas, a 20 FPU/g, por período de 72 horas a 60 °C por 24 horas e a fermentação conduzida por uma linhagem termotolerante de

Saccharomyces cerevisiae, denominada LBM-1, a 37 °C por 48 horas rendeu em média, 0,28 g de glicose/g de celulose para capim-andropogon e 0,31 g de glicose/g de celulose para capim-elefante na hidrólise e produziu 0,82 g de etanol/g de glicose para capim-elefante e 0,99 g de etanol/g de glicose para capim-andropogon, na fermentação.

Siqueira et al. (2016) utilizou o capim elefante como substrato para produzir etanol 2G, com 60% de celulose, obteve-se em média $7,11 \pm 1,25$ g/L de glicose com rendimento de 53,9 % (glicose/celulose) da hidrólise enzimática, após o pré-tratamento químico, empregando a enzima comercial Cellic Htec2 (Novozymes) à temperatura de 50-55°C, sob agitação constante por 72 horas, produzindo $3,19 \pm 0,48$ g/L de etanol na fermentação da parte líquida após a hidrólise com levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann®), ajustando-se o pH e operando a 30°C por 24 horas.

3.4 Fungos Filamentosos

Os microrganismos endofíticos são bactérias e fungos que convivem de forma simbiótica com a planta hospedeira (OWEN; HUNDLEY, 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005). Entretanto, um endofítico que se hospeda no tecido vegetal pode, em conformidade com as condições ambientais e do próprio estado fisiológico do hospedeiro, ser avaliado como um patógeno latente (AZEVEDO, 1998).

Os microrganismos mais eficientes na degradação de biopolímeros que consistem na parede de plantas são os fungos filamentosos, especialmente os basidiomicetos de podridão branca em razão da produção de uma bateria de enzimas extracelulares, como celulasas, hemicelulasas e lignases. Esses fungos representam uma matriz das enzimas potenciais para aplicações na produção de etanol devido à intensa atividade lignocelulósica (QUIROZ-CASTAÑEDA et al., 2011).

A produção das enzimas pelo cultivo de fungos é realizada por fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação submersa (FSm). A fermentação submersa é aquela onde a fermentação ocorre em meio com presença de água livre e geralmente com substratos solúveis. Na maioria da fabricação de enzimas em grande escala usa este tipo de fermentação, por ser melhor no monitoriamento e pela facilidade no manuseio. Celulasas produzidas por fungos filamentosos podem atuar em diversas faixas de pH e temperatura e a produção é influenciada por vários parâmetros incluindo a natureza do substrato, pH do meio,

disponibilidade de nutrientes, suplementação de indutor, temperatura de fermentação e entre outras (SINGHANIA et al., 2010).

Os principais fungos conhecidos para produção das enzimas celulasas e xilanases incluem: *Trichoderma reesei* (ou *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum* (ou *Chrysosporum lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Aspergillus sp*, *Schizophyllum sp*, *Chaetomium sp* (BISARIA; GHOSE, 1984) e entre outros.

3.4.1 *Botrytis sp*

O fungo filamentosos de gênero *Botrytis* é conhecido como um patógeno vegetal importante de uma gama de variedade de plantas hospedeiras (VERHOEFF, 1992). A espécie mais conhecida, *Botrytis cinerea*, dependendo do substrato (do local na célula vegetal), produz enzimas, tais como: cutinase (cutícula), poligalacturonases, pectinaliasas, pectina metil esterase (pectina, parede celular), proteinase ácida (proteína, parede celular), lacase (fenóis), α (1-3) glucanase (α (1-3) glucanos), Celulasas (Celulose), fosfolipases, fosfatidases, lipases (fosfolipídeos, membranas). A prevalência de uma ou mais fases do ciclo de vida do fungo vai depender dos fatores do hospedeiro (resistência, hábito de crescimento) e do ambiente (água livre, umidade relativa, temperatura, luz). O *B. cinerea* consegue desenvolver-se em temperaturas de 5 a 30 °C, com alta taxa umidade relativa (>90%) (MORANDI; MAFFIA, 2005).

Em seu trabalho, Galdino (2012) mostrou através do teste qualitativo realizado para detecção de atividade celulolítica do fungo *Botrytis sp*, isolado do pau-brasil, o crescimento de seu micélio degradando o papel filtro quando a celulose tornou-se a única fonte de carboidratos disponível, assim sendo, o *Botrytis* pode ser considerado um importante microrganismo na área biotecnológica por sua capacidade de produzir enzimas capazes de degradar matéria lignocelulósica.

Outro trabalho em pesquisa com o mesmo gênero do fungo, o *Botrytis ricini* URM 5627, apresentou ser muito promissor para obter açúcares fermentescíveis e produzir etanol 2G, devido uma alta produção das enzimas endoglucanase comparativa a outras descritas na literatura com alta estabilidade em temperatura e pH, degradando a biomassa lignocelulósica sem pré-tratamento (SILVA, 2018).

4 METODOLOGIA

4.1 Microrganismo

O *Botrytis sp* foi isolado como endofítico de ramos de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) em trabalhos de Iniciação Científica realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas, Microrganismos Endofíticos e Fitoterapia do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da UFAL e vem sendo mantido em água destilada esterilizada, em micoteca, com o código C23A''1.

4.2 Preparo de Meios de Cultura

4.2.1 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Para cada 1L de meio foram utilizados 200 g de batata inglesa previamente descascadas e cortadas em discos. Estas foram cozidas em 500 mL de água destilada, em seguida a mistura foi filtrada com papel de filtro. Ao filtrado foram adicionados 20 g de D-(+)-Glicose anidra P.A., 17 g de agar e completou o volume para 1000 mL de água destilada e, após total dissolução, a mistura foi esterilizada em autoclave por 20 minutos a 1 atm.

4.2.2 Meio Líquido Batata-Papel (BP)

Para o preparo do meio líquido BP, batata e papel filtro, foi realizado o mesmo procedimento do meio BDA, excluindo-se o ágar e substituindo a dextrose por papel filtro picado retangular (aproximadamente, 1 cm x 1 cm). O meio foi distribuído em frascos erlenmeyer 250 mL cada um comportando 100 mL do material (2g de papel para 100 mL do caldo de batata). A mistura foi esterilizada em autoclave por 20 minutos a 1 atm.

4.3 Avaliação da Evolução de Etanol no Caldo da Cultura Única do Fungo

4.3.1 Cultivo

O microrganismo inicialmente foi cultivado em meio BDA durante 10 a 12 dias. Após esse período, realizou-se o repique e inoculação de disco de 0,8 cm de diâmetro em 13 frascos contendo meio BP (Batata Papel), onde o fungo foi cultivado durante 4 semanas em frascos vedados (sistema fechado), em agitação orbital 113 rpm, a temperatura ambiente (~23-28°C).

4.3.2 Coleta

A cada semana, 3 frascos foram retirados para a coleta do caldo da cultura. Dos frascos recolhidos, micélio mais resíduo do papel e caldo foram separados por filtração simples utilizando filtro de papel, a parte sólida foi descartada. Após, o Filtrado da Cultura (FC) foi guardado no freezer para quantificação do etanol produzido pelo método espectrofotométrico.

4.4 Avaliação da Condição/Sistema na Produção de Etanol com *Botrytis sp*

4.4.1 Influência de Sais e do Sistema (Semi-Aberto/Fechado) na Produção de Etanol com *Botrytis sp*

Para verificação da necessidade de sais da atividade celulolítica na hidrólise do meio BP para produção de etanol, foi realizado meio BP sem e com adição de sais, tais sais são: K_2HPO_4 (1 g/L), $MgSO_4$ (12 g/L), Na_2CO_3 (1 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (2 g/L). Todos eles em sistema Semi-Aberto (SA) (utilizando chumaço de algodão e gaze). Para verificação do Sistema Semi-aberto/Fechado, foi realizado meio BP Semi-Aberto e meio BP com frascos vedados, Fechado (F). Foi realizado o mesmo procedimento de cultivo do item 4.3.1, em triplicata, em todos, durante 10 dias, em agitação orbital 160 rpm, à temperatura ambiente (~23-28°C). Após o cultivo foi realizado o procedimento de coleta do item 4.3.2. para análise de Açúcar Redutor Total (ART) e Etanol.

4.4.1.1 Avaliação da Produção de Etanol com uma Segunda Fermentação do Filtrado da Cultura com Levedura comercial

Foi coletado 50 mL dos Filtrados dos sistemas, colocados em banho maria a 60°C por 30 min com o objetivo de eliminar a carga microbiológica dos filtrados. Após resfriar foi adicionado 1 g do Fermento Biológico Seco Instantâneo da marca Dr.Oetker (*Saccharomyces cerevisiae*) nos frascos com os filtrados. O cultivo foi realizado em sistema fechado, na estufa, sem rotação, a 35°C.

4.4.2 Influência da Temperatura na Produção de Etanol com *Botrytis sp*

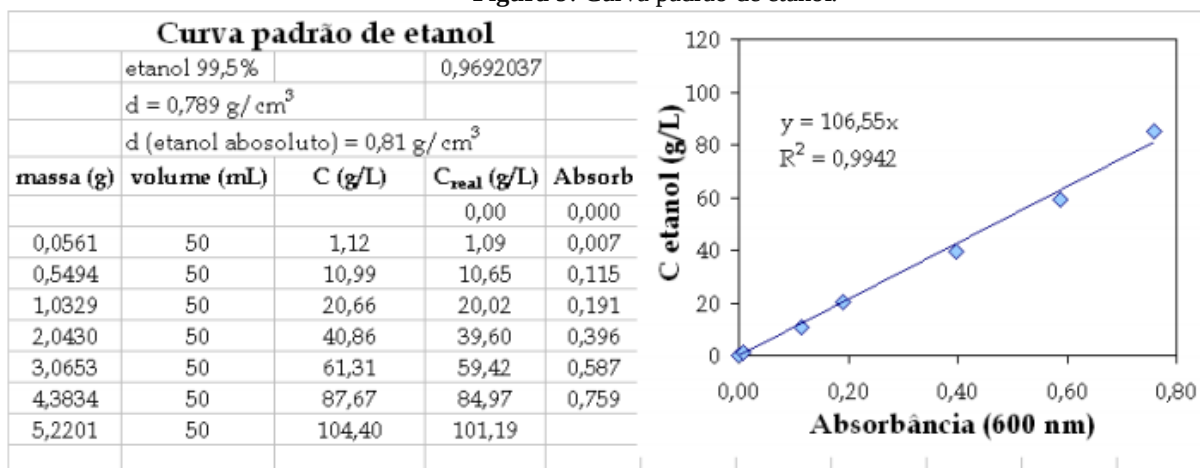
Foi realizado o mesmo procedimento do item 4.4.1 para o sistema BP Fechado, porém a 35°C e durante 48 h, para comparação do etanol produzido.

4.5 Quantificação de Etanol pelo Método Espectrofotométrico

Coletou-se 10 ml do filtrado da cultura e o destilou, após o primeiro gotejamento, recebido em erlenmeyer de 250 ml, por 4 min e em seguida interrompeu-se a destilação. Diluiu-se o destilado em um balão de diluição de 100 ml e completando-se o volume com água destilado até o menisco do balão. A partir deste álcool diluído foi feito o método espectrofotométrico para determinação do teor alcoólico, método proposto por Joslyn (1970) e aperfeiçoado por Aboutboul (trabalho não publicado):

Colocou-se 2 mL do destilado diluído em um tubo de ensaio com tampa rosqueável e acrescentou-se 2 ml de solução de dicromato de potássio; fechou-se o tubo e o colocou-se em banho a 60°C por 30 min. Em seguida, depois que o tubo resfriou a temperatura ambiente realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 600 nm, utilizando água destilada no lugar da amostra destilada para zerar o aparelho (branco). Após a leitura, calculou-se a concentração de etanol a partir de amostras de etanol diluídas e destiladas, conforme mostra a Figura 9.

Figura 9: Curva padrão de etanol.

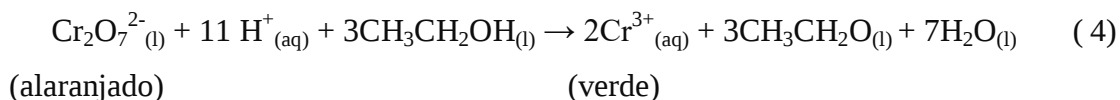


Fonte: ALMEIDA; SILVA, 2015.

Curva padrão:

$$C_{\text{etanol}} = 106,55 \cdot \text{absorbância}(600\text{nm}) \quad R^2 = 0,9942 \quad (1)$$

A reação do $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ em meio ácido com etanol procede segundo a Reação 4. Nessa reação o cromo é reduzido e dependendo da concentração de etanol e ácido pode assumir diferentes estados de oxidação. O cromo (VI) alaranjado é reduzido a cromo (III) verde ou a cromo (II) azul se o ácido estiver concentrado.



4.6 Quantificação de Açúcar Redutor Total (ART) pelo Método do DNS

Primeiramente foi realizada o procedimento da hidrólise de açúcares não-redutores: foi transferido 1 mL da amostra para um tubo de ensaio e adicionou-o 5 mL de H_2SO_4 1,5M, l, levou-o a banho fervente por 15 min e agitando-o ocasionalmente para hidrolisar os polissacarídeos e outros açúcares não-redutores (ao menos a cada 5 min). Após resfriar, adicionou 1 gota de fenolftaleína e, cuidadosamente, com o auxílio de pipeta Pasteur, adicionou gota a gota uma solução de NaOH 10% até a coloração rósea. Em seguida, adicionou 1 gota de H_2SO_4 1,5M ou até retornar a cor original. Homogeneizou a amostra e filtrou (quando necessário) para proveta, completando o volume com água destilada até 50 mL.

Após a hidrólise foi realizada a determinação de açúcares redutores em glicose pelo método do DNS: Transferiu 0,25 mL da amostra para um tubo de ensaio com tampa e

adicionou 0,5 mL de água destilada. Quando o banho de água estava fervendo adicionou 0,25 mL do reagente de DNS e levou-o a amostra para banho fervente por 5 min, permitindo que ocorra a reação entre a glicose e o DNS. Após resfriar o tubo em banho de gelo, ajustou o volume com água destilada para 5 mL (adicionando-o 4 mL de água) e por fim, leu as amostras em absorbância a 540nm. Para “zerar” o espectrofotômetro e ler as absorbâncias foi necessário fazer um branco, substituindo na reação de DNS a amostra por água destilada.

A partir da curva padrão de concentrações conhecidas de glicose tem-se a equação da reta que permitirá calcular a concentração de glicose em cada amostra. A equação 2 da curva padrão:

$$\text{Concentração (g/L)} = \text{Abs (540 nm)} * 6,6119 * 50 \quad R^2 = 0,9917 \quad (2)$$

Obs.: Curva obtida pelo roteiro de aula de laboratório de engenharia química 2 (LEQ2). A equação ainda foi multiplicada pelo fator de diluição de hidrólise, no caso, 50.

4.7 Cálculos

4.7.1 Rendimento de Fermentação (RF)

O rendimento em grama de etanol por grama de açúcar redutor total inicial (ART_i), considerando o rendimento teórico de 0,511 g_{etanol}/gART como 100%, foi determinado pela Equação 3.

$$RF = \frac{C_{\text{etanol } f}}{0,511 \times C_{\text{ARTi}}} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

RF= rendimento de etanol formado em relação aos ART inicial (%);

C_{etanol f} = concentração de etanol (g/L) ao final da fermentação;

C_{ARTi} = concentração de açúcar redutor total inicial (g/L).

4.7.2 Rendimento de Hidrólise (RH)

Considerando o total de celulose na amostra como 100% de celulose (papel filtro) e sua massa inicial, é possível calcular o rendimento das reações de hidrólise. Para isso,

tomaram-se os valores de ART e o fator de conversão de glicose em celulose, tal Lu et al (2013). O cálculo do rendimento da hidrólise foi realizado pela Equação 4.

$$RH = \left(\frac{C_{ARTf} - C_{ARTi}}{C_{celulose}} \times 0,9 \right) \times 100 \quad (4)$$

Sendo: RH: rendimento da hidrólise em porcentagem (%);

C_{ARTf} : concentração de açúcar redutor total final (g/l);

C_{ARTi} = concentração de açúcar redutor total inicial (g/L).

$C_{celulose}$ = concentração de celulose da biomassa (g/l);

0,9 = fator de conversão da celulose.

4.7.3 Produtividade de Etanol (PrE)

O cálculo da produtividade, em relação ao etanol produzido, é uma grandeza cinética que expressa a velocidade média de produção. A produtividade foi calculada pela Equação 5.

$$PrE = \frac{C_{etanol f}}{t} \quad (5)$$

Em que:

PrE = produtividade do etanol (g/ L.h);

$C_{etanol f}$ = concentração de etanol (g/L) ao final da fermentação;

t = tempo final de fermentação (h).

4.7.4 Concentração de Etanol Expressa em Porcentagem Volumétrica % (v/v)

A concentração de etanol pode ser expressa também em porcentagem volumétrica, que representa a relação entre o volume de etanol puro pelo volume total da suspensão. A porcentagem volumétrica pode ser obtida através da Equação 6.

$$V/V (\%) = \frac{C_{etanol f}}{789} \times 100 \quad (6)$$

Em que:

%(v/v) = Teor alcoólico expresso em porcentagem volumétrica;

$C_{etanol f}$ = concentração de etanol (g/L) ao final da fermentação;

Densidade do etanol puro à 25°C = 789 g/L.

4.8 Tratamento de Dados

Todos os dados analisados foram tratados com o auxílio do Microsoft Excel® (2010) e do Minitab® (2018). Para verificação da existência de equivalência dos dados dos experimentos, foi feita a Análise de Variância (ANOVA) fator único, com 0,05 de significância. Enquanto, para identificar qual(is) dos processos são diferentes foram feitos métodos estatísticos de comparação como Tukey e Dunnett.

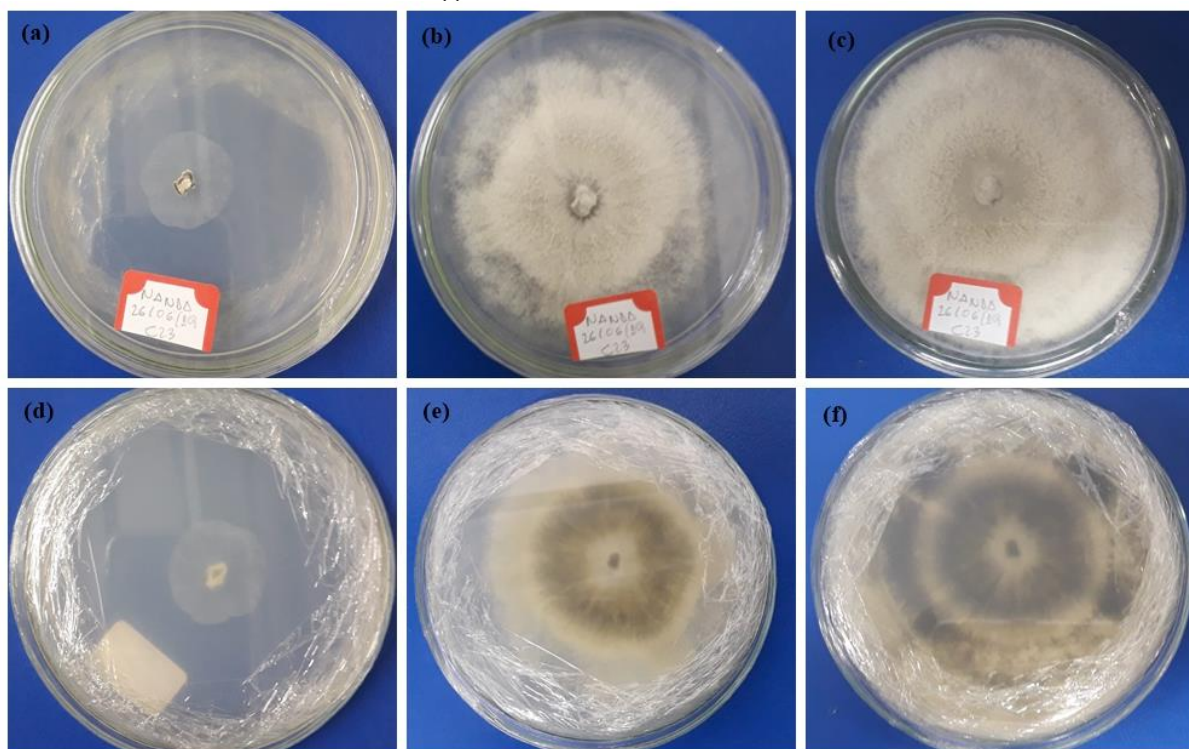
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Há vários aspectos para viabilizar a produção utilizando microrganismos que inclui a seleção do meio, o tipo de processo (em estado sólido, semi-sólido, líquido) e as condições ótimas para o cultivo (temperatura, pH, aeração e agitação, e outras) (VICCINI, 2004). Desta forma, este trabalho explora algumas condições de cultivo e influência de sais na solução nutriente escolhida (caldo da batata inglesa) do meio BP. Devido aos experimentos deste trabalho tenham sido em condições, parâmetros e meio diferentes dos demais trabalhos para produção de etanol de segunda geração, impossibilitou a comparação direta dos resultados encontrados na literatura, no entanto, houve apenas a comparação quantitativa final do processo para se ter uma noção e poder avaliar o processo de produção com o fungo *Botrytis sp.*

5.1 Cultivo do Fungo *Botrytis sp*

A Figura 10 mostra o cultivo do fungo *Botrytis sp* em placas de Petri entre 2 a 16 dias.

Figura 10: Cultivo do *Botrytis sp* em meio BDA. (a) 2 dias de cultivo vista de cima; (b) 6 dias de cultivo vista de cima; (c) 16 dias de cultivo vista de cima; (d) 2 dias de cultivo vista de baixo; (e) 6 dias de cultivo vista de baixo; (f) 16 dias de cultivo vista de baixo.



Fonte: Autora, 2020.

A Figura 10 mostra que o fungo cresceu rapidamente completando-se a placa em até 16 dias. Inicialmente o fungo apresentou coloração branca e foi escurecendo gradativamente.

5.2 Avaliação da Evolução de Etanol no Caldo da Cultura Única do Fungo

A Tabela 4 apresenta os dados obtidos pela curva padrão da concentração de etanol a partir da leitura do espectrofotômetro a 600nm das amostras do meio de cultura papel picado em caldo de batata inglesa (BP) sendo o branco, o ponto zero do processo, e das triplicadas (réplicas) após o cultivo do fungo em meio BP, em 1 semana e assim sucessivamente até 4 semanas de cultivo, à temperatura ambiente e à 113 rpm de rotação. Os valores apresentados correspondem à média das concentrações de etanol das 3 réplicas realizadas de forma independente nas mesmas condições para cada semana. Todos os 12 experimentos foram de forma independentes para simulação de um sistema fechado em hipóxia (teor de oxigênio limitado/baixo). Na amostra Fungo/Batata representa o cultivo do fungo apenas em caldo de batata inglesa após 4 semanas.

Tabela 4: Dados das absorbâncias a 600nm das amostras, suas respectivas concentrações reais de Etanol e média das triplicatas.

Semana	Amostra	Absorb (nm)	Creal (g/L)	Cmédia (g/L)	Desvio Padrão	% (v/v)
0	Branco	0,000	0,000	0,000	-	0,000
1	1.1	0,008	0,852	0,639	0,369	0,081
	1.2	0,002	0,213			
	1.3	0,008	0,852			
2	2.1	0,008	0,852	0,675	0,222	0,086
	2.2	0,004	0,426			
	2.3	0,007	0,746			
3	3.1	0,002	0,213	0,391	0,163	0,050
	3.2	0,004	0,426			
	3.3	0,005	0,533			
4	4.1	0,013	1,385	1,066	0,320	0,135
	4.2	0,010	1,066			
	4.3	0,007	0,746			
4	Batata/ fungo	0,000	0,000	0,000	-	0,000

Fonte: Autora, 2020.

Na Tabela 4 é possível observar que não há produção de etanol no cultivo do fungo *Botrytis sp* em caldo de batata sem a fonte de material celulósico no meio. Na Figura 11

mostra este experimento após 4 semanas, onde houve crescimento e reprodução de micélio do fungo apenas com o caldo da batata.

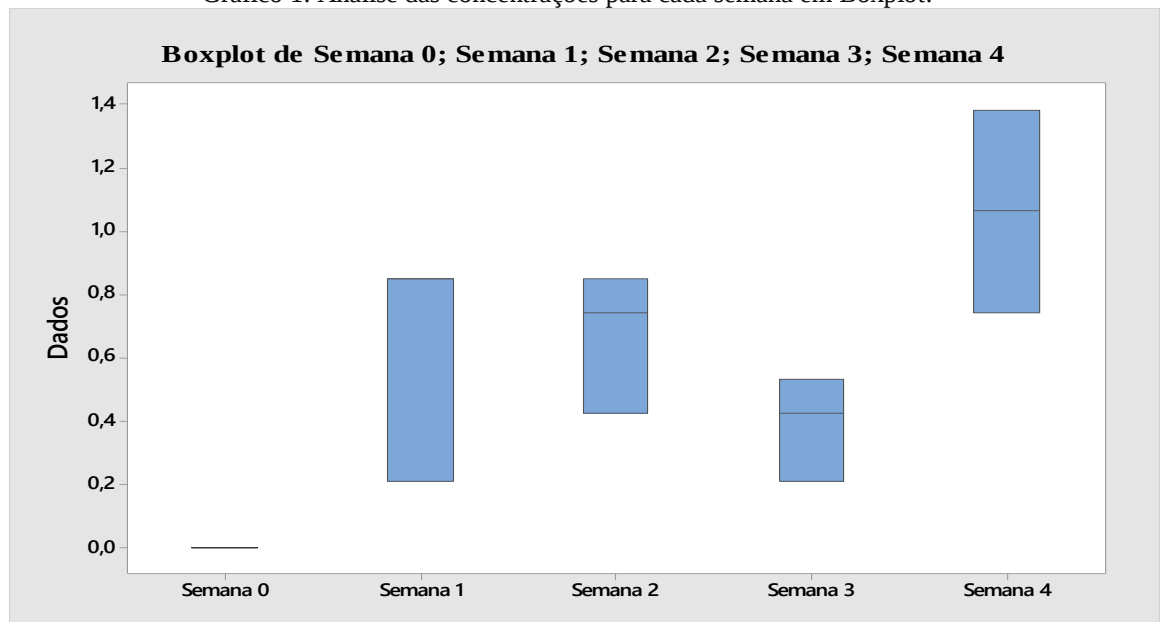
Figura 11: Cultivo do fungo *Botrytis sp* em caldo de batata inglesa após 4 semanas. (a) Vista de frente; (b) Vista da base.



Fonte: Autora, 2020.

Para comparar a produção de etanol por meio da concentração das réplicas para cada semana e analisar a assimetria dos dados foi feito o boxplot (Gráfico 1).

Gráfico 1: Análise das concentrações para cada semana em Boxplot.



Fonte: Autora, 2020.

Percebe-se no Gráfico 1 que a caixa da semana 4 (cultivo do fungo por 4 semanas) está posicionada na parte superior em relação as demais caixas, ou seja, a média e o valor

mediano são bem altos, no entanto, uma altíssima variabilidade dos dados, isso traz uma certa imprevisibilidade (um muito alto, outro muito baixo). Já as caixas das semanas 1 e 2, encontram-se em posições relativamente iguais, medianas na tela, porém, a da segunda é mais achatada (variabilidade menor) que a da primeira. Enquanto que com 3 semanas, encontra-se na posição inferior (valores médios mais baixos), contudo, menor variabilidade.

Na Tabela 5 mostra os dados obtidos na análise de variância (ANOVA) de fator único utilizando o Excel® (2010) para verificar se as concentrações médias semanais produzidas eram significativamente diferentes.

Tabela 5: Análise de variância (ANOVA) das concentrações em triplicatas para cada semana de cultivo com *Botrytis sp.*

Fonte da variação	Soma dos Quadrados(SQ)	Graus de Liberdade(gl)	Quadrado Médio (MQ)	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,851546	4	0,462887	7,37294	0,00493	3,47805
Dentro dos grupos	0,627818	10	0,062782			
Total	2,479364	14				

Fonte: Autora, 2020.

Observa-se pela Tabela 5, que o valor de F (7,37), é maior que o valor de F crítico, isto quer dizer, que pelo menos 2 semanas são significativamente diferentes com 95% de confiabilidade.

Na Tabela 6 mostra os resultados obtidos no método de Dunnett que comparou simultaneamente as médias das concentrações das semanas com o controle (Semana 0) utilizando Minitab® 18.

Tabela 6: Método de Dunnett e Confiança de 95% das concentrações em triplicatas para cada semana de cultivo com *Botrytis sp.*

Fator	N	Média	Agrupamento
Semana 0 (controle)	1	0	A
Semana 4	3	1,066	
Semana 2	3	0,675	A
Semana 1	3	0,639	A
Semana 3	3	0,3907	A

Fonte: Autora, 2020.

Nota: As médias não rotuladas com a letra A são significativamente diferentes da média do nível de controle.

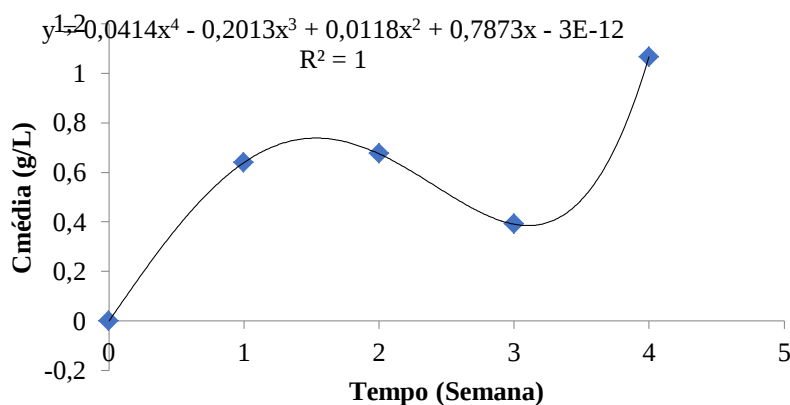
Observa-se pelo método de Dunnet na Tabela 6 que estatisticamente na semana 4(com 4 semanas de cultivo), com 95% de confiabilidade, é significativamente diferente da média da semana 0. Pode-se afirmar que houve uma concentração média significativamente maior que as demais semanas, ou seja, maior produção de etanol é com 4 semanas.

Desta forma verifica-se que houve o processo de fermentação submersa produzindo etanol e em maior concentração com 4 semanas. A concentração média em 3 semanas de cultivo, foi menor que as com menos semanas, como são culturas independentes, as células do fungo possivelmente das réplicas 3.1, 3.2, 3.3, não foram eficientes tanto quanto, ou até pode ter existido alguma contaminação que prejudicou o processo, pode também ter acontecido do etanol produzido ter sido metabolizado. Segundo Porto (2005), o etanol é produto de excreção do microrganismo, entretanto ele e mais outros produtos como glicerol e ácidos orgânicos podem ser metabolizados para gerar mais ATP, porém a condição seria de aerobiose. Apesar dos ensaios terem sido feitos em sistema fechado, em condições de hipóxia, a pouca quantidade de oxigênio poderia ter sido utilizada para tal processo. Outra observação é que apesar da área do inóculo ter sido a mesma para todos os experimentos, não se pode afirmar que havia o mesmo volume de células em todos, desta forma, a quantidade inoculada pode ter influenciado no teor alcoólico.

A formação de subprodutos, na fermentação, bem como o crescimento celular, inevitavelmente desvia alguns intermediários glicolíticos para as suas correspondentes rotas metabólicas, diminuindo o rendimento de produção do etanol (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008)

No Gráfico 2 mostra este aumento médio da concentração na produção de etanol junto com sua curva de regressão polinomial.

Gráfico 2: Evolução da Produção Média de Etanol no Caldo da Cultura Única do Fungo *Botrytis sp.*



Fonte: Autora, 2020.

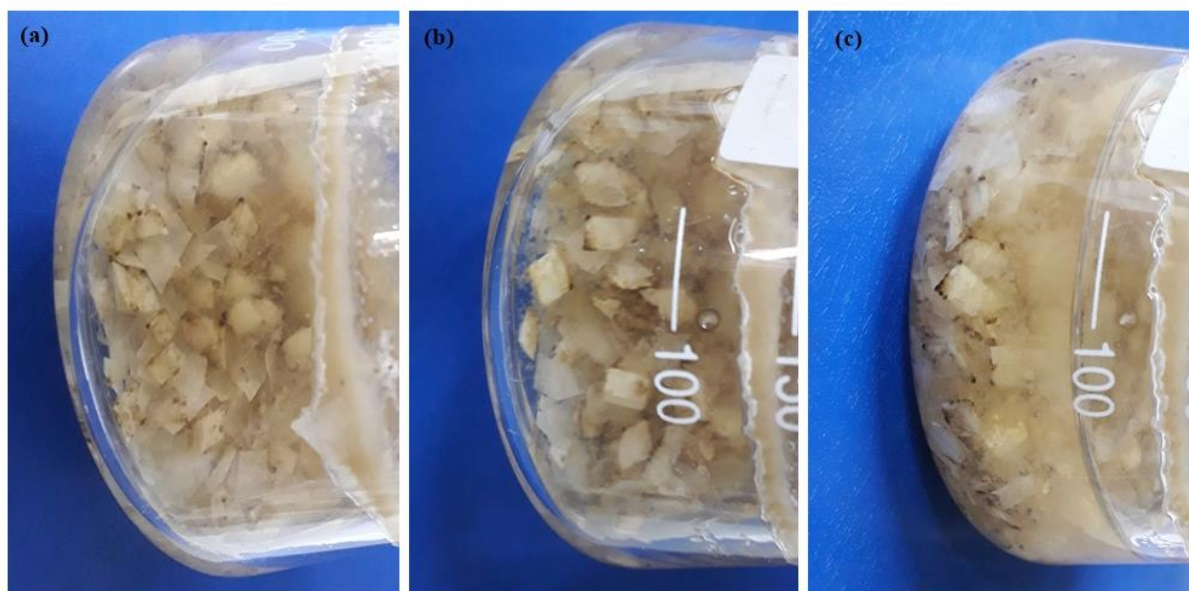
Nas Figuras 12, 13 e 14 mostram o meio BP e as culturas triplicatas com 1 e com 4 semanas de cultivo, respectivamente.

Figura 12: Meio BP sem fungo, antes do cultivo.



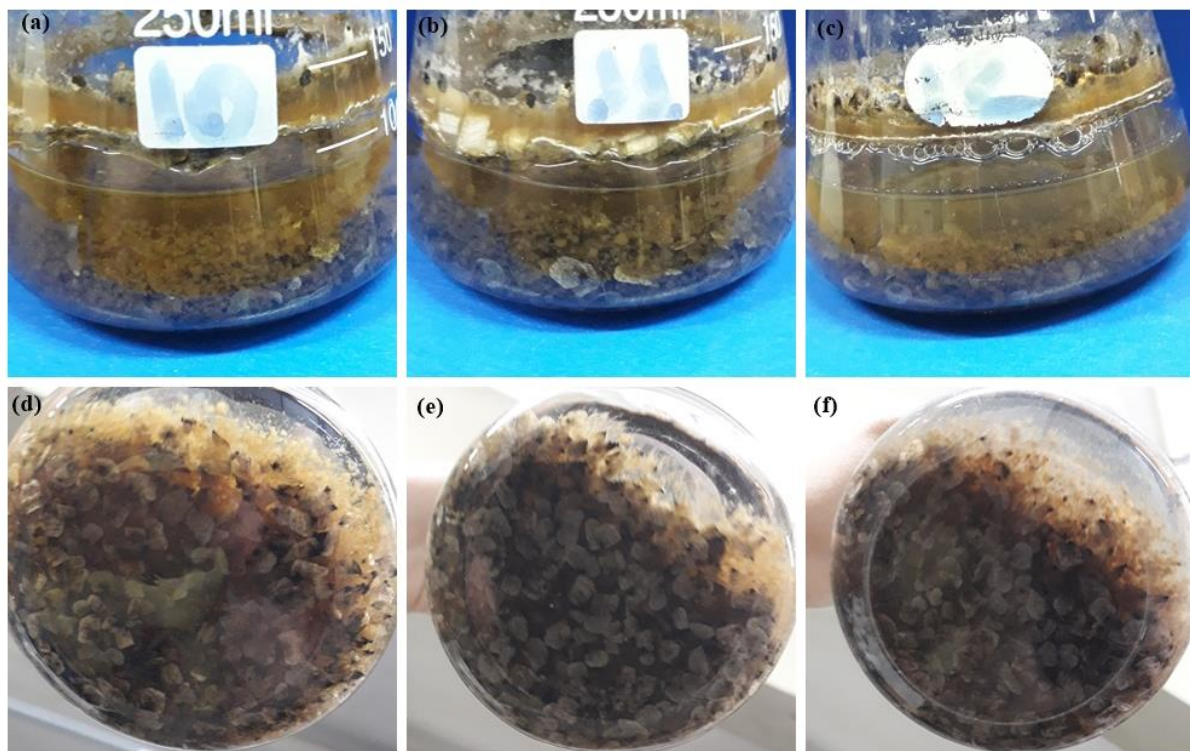
Fonte: Autora, 2020.

Figura 13: Cultivo de 1 semana em meio BP do fungo *Botrytis sp.* (a) Frasco 1.1; (b) Frasco 1.2; (c) Frasco 1.3.



Fonte: Autora, 2020.

Figura 14: Cultivo de 4 semanas em meio BP do fungo *Botrytis sp.* (a) Frasco 4.1 vista lateral; (b) Frasco 4.2 vista lateral; (c) Frasco 4.3 vista lateral; (d) Frasco 4.1 vista de baixo; (e) Frasco 4.2 vista de baixo; (f) Frasco 4.3 vista de baixo.



Fonte: Autora, 2020.

O crescimento dos fungos filamentosos é uma combinação da ampliação de suas hifas e a formação de outras novas por ramificação do micélio, que permite o fungo adentrar o substrato sólido e formar uma estrutura sólida, concedendo uma vantagem em relação aos fungos unicelulares em apropriar-se do substrato sólido e utilizar-se dos nutrientes disponíveis. Além disso, as exoenzimas hidrolíticas excretadas pelas hifas sem muita diluição na fermentação submersa aumenta ainda mais seu desempenho da penetração no substrato aumentando a acessibilidade de todos os nutrientes disponíveis (RAIMBAULT, 1998). Desta forma, apesar do caldo de batata ter uma composição quimicamente indefinida e complexa é um meio altamente nutritivo para o fungo, no qual foi utilizado para o seu crescimento em quantidade. Comparando as Figuras 11, 12, 13 e 14, nota-se a maior concentração de micélios em 4 semanas meio BP (Figura 14) que em apenas caldo de batata (Figura 11), certamente o fungo após ou concomitantemente utilizar-se do amido contido no caldo adentrou-se no substrato celulósico (única fonte sólida de carbono) degradando-o.

A celulase é uma enzima adaptativa em fungos e o substrato indutor é a celulose, sendo esta insolúvel. Seus produtos solúveis são os indutores naturais das enzimas que atacam substratos insolúveis, ou seja, quando o substrato está presente, ele é hidrolisado e os produtos

solúveis assimilados pela célula que induzem mais enzimas (MANDELS; REESE, 1957, 1960). Logo, as hifas do *Botrytis sp* ao penetrar o papel celulósico no meio, este induziu a produção da celulase pelo fungo, que hidrolisou a celulose em açúcares fermentescíveis, e após, produzindo etanol pelo processo fermentativo. Segundo Mandels & Reese (1960) que estudaram os efeitos de alguns nutrientes para produção de celulase, o amido pode ter efeito inibitório e inativador destas enzimas resultando o rápido crescimento do microrganismo, porém com baixo rendimento. Isso pode explicar o grande crescimento da massa fúngica e baixo teor alcoólico no caldo. Além disso, as condições do sistema não foram favoráveis, além da temperatura abaixo tanto da temperatura ideal para atuação das enzimas quanto para o processo fermentativo, além da baixa rotação e a pequena superfície de contato do substrato.

5.3 Avaliação dos Parâmetros da Condição/Sistema na Produção de Etanol com *Botrytis sp*

5.3.1 Influência da Suplementação de Sais e do Sistema (Semi-Aberto/Fechado) na Produção de Etanol com *Botrytis sp*

a. Influência da Suplementação de Sais

Para o efetivo crescimento do microrganismo, além da fonte de carbono, já mencionada, é necessária suplementação do meio com nutrientes minerais, ureia, sulfato de amônio entre outros, e elementos traços como Fe, Zn, Mn e Co. Esses nutrientes minerais participam do metabolismo do microrganismo como cofatores enzimáticos, e até como moduladores conformacionais das estruturas enzimáticas (MAEDA, 2010). Devido o caldo da batata ter composição quimicamente indefinida e complexa, foi-se necessária a verificação de uma suplementação de sais no meio BP para a atividade celulolítica na hidrólise do papel correlacionada para produção de etanol. Antes das análises do etanol e ART, foi verificado o pH do meio BP (Amostra 0) com fita medidora de pH sendo aproximadamente igual a 7.

A Tabela 7 apresenta os dados obtidos pela curva padrão da concentração de etanol a partir da leitura do espectrofotômetro para o ART contido nas amostras do meio de cultura BP com e sem a suplementação de sais em triplicatas após 10 dias de cultivo, sendo o branco, o ponto zero do processo, à temperatura ambiente e 160 rpm, e em sistema considerado semi-aberto devido a possibilidade de trocas gasosas com o meio exterior através do algodão. Os valores apresentados correspondem à média das concentrações de etanol de 3 experimentos

realizados de forma independente nas mesmas condições. E o Gráfico 3 é a representação da produção de ART com o tempo comparando os dois experimentos.

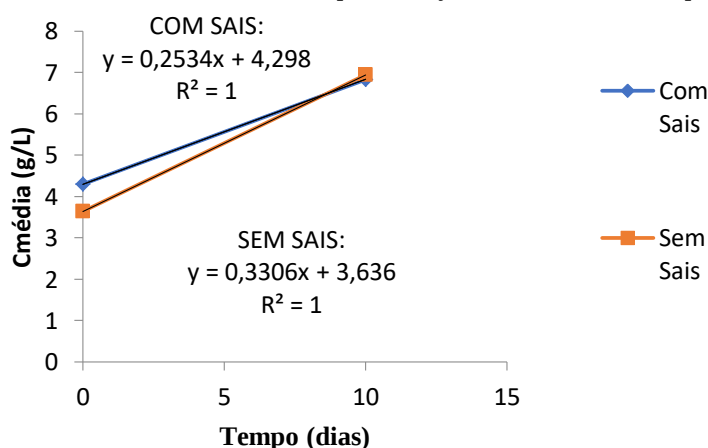
Tabela 7: Dados do ART contido nos caldos com e sem suplementação de sais.

Tabela 7: Dados do TAT e Crea nos eidos com e sem suplementação de sais.									
COM SAIS						SEM SAIS			
Tempo(dias)	AMOSTRAS	abs (nm)	Creal(g/L)	Cmédia(g/L)	ΔCmédia(g/L)	abs (nm)	Creal(g/L)	Cmédia(g/L)	ΔCmédia(g/L)
0	0	0,013	4,298	-	2,534	0,011	3,636	-	3,305
	1	0,021	6,942			0,021	6,942		
10	2	0,020	6,612	6,832±0,156		0,022	7,273	6,942±0,270	
	3	0,021	6,942			0,020	6,612		

Fonte: Autora, 2020.

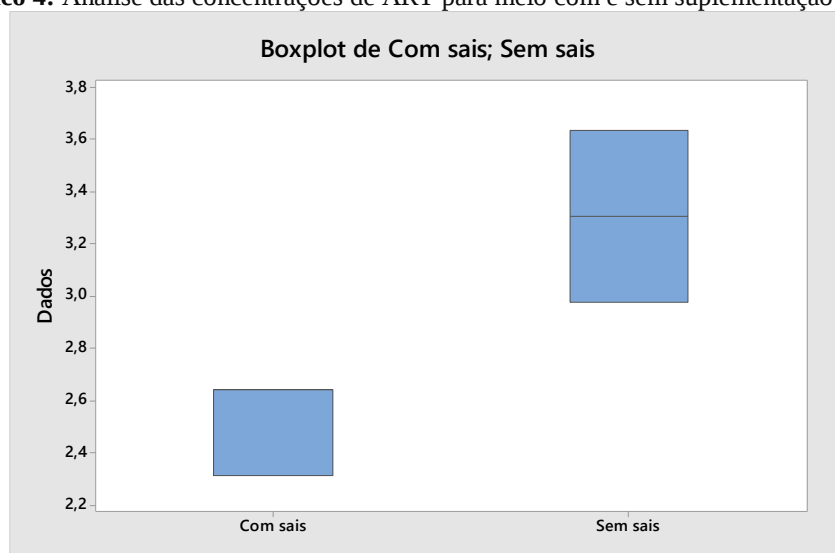
Δ Cmédia: Variação da concentração de ART: [concentração final média de ART (C_{ARTf}) - concentração inicial de ART (C_{ARTi})].

Gráfico 3: ART Com e Sem Suplementação de Sais versus Tempo.



Fonte: Autora, 2020.

Observa-se tanto no Gráfico 3 (coeficientes angular das retas) quanto na Tabela 7 que o meio BP sem suplementação de sais foi o que continha a maior concentração de açúcar e o maior delta (variação). Isto significa que as reações de hidrólise no meio sem suplementação foram mais eficazes que com suplementação e que possivelmente o caldo da batata já continha os sais e os nutrientes necessários para tais processos, com adição dos sais houve uma pequena influência que talvez tenha reduzido a hidrólise para produção de ART. Hipoteticamente, os sais poderiam ter sido utilizados pelo microrganismo em outra rota metabólica. A produção de ART sem sais foi 30,43% maior do que com suplementação. Para facilitar o tratamento estatístico e verificar qual o melhor (maior ART), foi subtraída a concentração de ART inicial (0 dia/ meio BP) em cada réplica, desta forma o Gráfico 4 mostra as concentrações de ART nas réplicas com sais e sem sais em boxplot e a Tabela 9 contém os resultados da análise de variância.

Gráfico 4: Análise das concentrações de ART para meio com e sem suplementação de sais.

Fonte: Autora, 2020.

Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) das concentrações de ART em triplicatas para meio com e suplementos de sais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,8947482	1	0,8947482	12,29638	0,0247474	7,7086474
Dentro dos grupos	0,2910607	4	0,0727652			
Total	1,1858088	5				

Fonte: Autora, 2020.

A partir dos valores do F e F crítico (Tabela 8), em que o primeiro é muito maior que o segundo, com valor-P menor que 0,05, pode-se afirmar que os parâmetros (com e sem suplementação) são significativamente distintos e pelo Gráfico 4, nota-se que sem sais, apesar de ter uma maior variabilidade, tem valores médios maior que com sais.

Fazendo o mesmo tratamento que foi feito com ART, fez para as concentrações de etanol, nas Tabelas 9 e 10 apresentam os dados obtidos pela curva padrão da concentração de etanol a partir da leitura do espectrofotômetro para o etanol contido nas amostras dos mesmos experimentos e a ANOVA. No Gráfico 5 representa a produção de etanol com o tempo comparando os dois experimentos e seus coeficientes angulares através das suas respectivas equações da reta (Gráfico 5a) e as concentrações em boxplot (Gráfico 5b).

Tabela 9: Dados do Etanol contido nos caldos com e sem suplementação de sais.

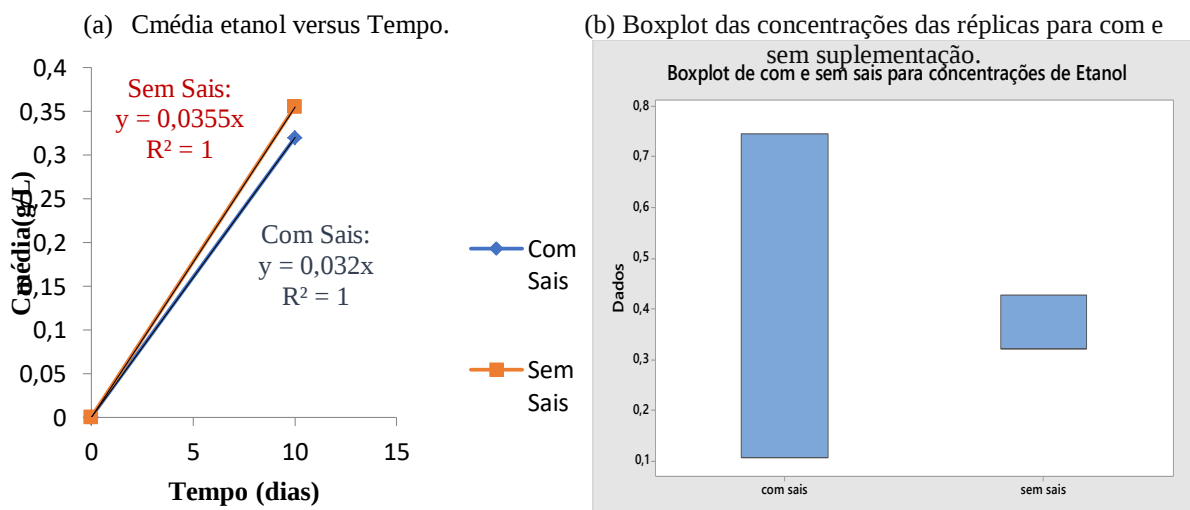
Tempo(dias)	AMOSTRAS	COM SAIS			SEM SAIS		
		abs(nm)	Creal(g/L)	Cmédia(g/L)	abs(nm)	Creal(g/L)	Cmédia(g/L)
0	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	0,007	0,746		0,003	0,320	
10	2	0,001	0,107	0,320±0,301	0,004	0,426	0,355±0,050
	3	0,001	0,107		0,003	0,320	

Fonte: Autora, 2020.

Tabela 10: Análise de variância (ANOVA) das concentrações de etanol em triplicatas para meio com e suplementos de sais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,0018727	1	0,0018727	0,0267806	0,8779441	7,7086474
Dentro dos grupos	0,2797047	4	0,0699262			
Total	0,2815773	5				

Fonte: Autora, 2020.

Gráfico 5: Etanol Com e Sem Suplementação de Sais.

Fonte: Autora, 2020.

De acordo com a Tabela 9 e o Gráfico 5a o caldo BP sem suplementação continha maior teor alcoólico do que com suplementação de sais, como é previsto, já que houve melhor desempenho na hidrólise. A quantidade de ART residual no meio após 10 dias indica que poderia ter maior concentração de etanol, ou seja, o processo de fermentação alcoólica do *Botrytis sp* é muito lento. Tanto as comparações de açúcar total quanto de etanol produzidas podem ser visto pelos rendimentos e produtividades na Tabela 11. No entanto, na análise de variância na Tabela 10, verifica-se que em relação à concentração de etanol não há diferença significativa entre os meios com e sem sais, são estatisticamente iguais, já que o F é menor

que o F crítico e valor-P é maior que 0,05. Além disso, no Gráfico 5b, mostra-se que o experimento com sais é imprevisível, há uma alta variabilidade, devido à altura (amplitude) da barra ser muito maior.

A Tabela 11 expõe o rendimento de hidrólise (RH) que foi calculado utilizando o ART_f como a soma do ART residual (aquele encontrado na amostra da cultura depois de um certo tempo) e ART teórico que foi convertido em etanol, e considerando o papel constituído 100% de celulose de acordo com as especificações da embalagem. O ART teórico foi calculado diante da equação de Gay-Lussac, onde 51,1 g etanol/100g glicose. Além disso, calculou-se o rendimento de fermentação (RF) utilizando o ART inicial aquele já contido no meio, produtividade de etanol (PrE) e o teor alcoólico em v/v.

Tabela 11: Avaliação dos Rendimentos de hidrólise e fermentação, produtividade e teor alcoólico para com e sem suplementação.

	RH(%)	RF(%)	PrE (g/L.dia)	v/v (%)
Com Sais	14,22	14,56	0,032	0,041
Sem Sais	18,00	19,11	0,036	0,045

Fonte: Autora, 2020.

De acordo com Ghosh & Ghose (2003) a hidrólise enzimática possui um rendimento de açúcar menor que 20%, quando sem pré-tratamento, por outro lado quando há pré-tratamento o rendimento pode alcançar até mais que 90%. Os rendimentos RH apesar do tempo longo de processo e menores a 20%, porém aproximado, 18%, foram relativamente aceitáveis devido às suas condições não estarem dentro do ótimo para atuação das enzimas (pH 4,8, temperatura entre 45-50 °C, baixa superfície de contato do substrato) e foram relativamente próximos aos rendimentos obtidos na dissertação de Pereira (2013), onde a hidrólise enzimática utilizando as enzimas puras com concentração equivalente a 20 FPU/g, a 60 °C e sob agitação a 150 rpm no Capim-andropogon e no Capim-mombaça teve rendimentos de 28% (glicose/celulose), após tratamento com ácido. Portanto, RH sem sais foi baixo, porém, próximo, em média, relatada na revisão literária.

Em relação aos rendimentos RF apresentaram valores inferiores ao valor teórico de 0,51 g de etanol por grama de glicose. Estes rendimentos deveriam ser superiores ao valor teórico pelo motivo de os cálculos terem sido baseados nas concentrações de ART obtidas apenas do meio no início do processo, ou seja, do caldo da batata, pois não pode contabilizar o ART convertido obtido da hidrólise. Se todo o açúcar fermentescível oriundo da hidrólise que ocorreu simultaneamente ao processo de BCP (Bioprocessamento Consolidado) tivesse

convertido em etanol os rendimentos de fermentação teriam sido maiores que 51,1%. Apesar disso, tem que considerar que as condições podem não terem sido favoráveis (temperatura ideal da fermentação 30-37 °C e sistema semi-aberto).

b. Sistema Semi-Aberto/Fechado

Nestes sistemas estão relacionados à disponibilidade de oxigênio/trocas gasosas nos processos metabólicos do *Botrytis sp* para verificação na obtenção do etanol. Desta forma as Tabelas 12 e 13 apresentam os dados obtidos pelas curvas padrão da concentração de ART e etanol a partir da leitura do espectrofotômetro para o ART e etanol, respectivamente, contidos nas amostras do meio de cultura BP semi- aberto e fechado em triplicatas após 10 dias de cultivo, sendo o branco, o ponto zero do processo, à temperatura ambiente e 160 rpm. Os valores apresentados correspondem à média das concentrações de etanol de 3 réplicas realizados de forma independente nas mesmas condições. Os Gráficos 6 e 7 são a representação da produção média de ART e do etanol em relação ao tempo de cultivo e a comparação pela dispersão dos dados das concentrações das réplicas de ART e etanol em boxplot.

Tabela 12: Dados para análise do ART contido nos caldos semi- aberto e fechado.

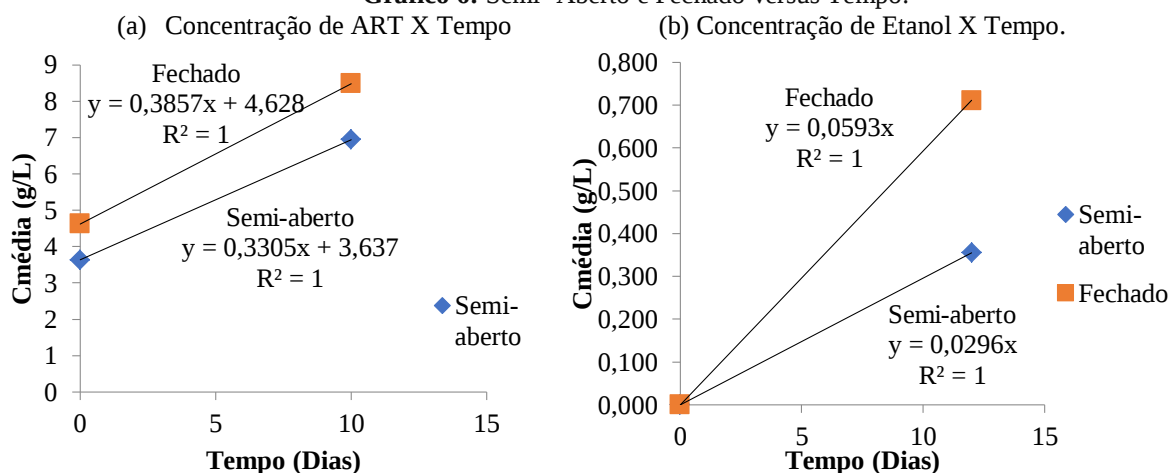
Tempo (dias)	Amostras	SEMI-ABERTO					FECHADO				
		abs	Creal (g/L)	Cmédia (g/L)	Desvio Padrão	Δ Cmédia (g/L)	Abs	Creal (g/L)	Cmédia (g/L)	Desvio Padrão	Δ Cmédia (g/L)
0	0	0,011	3,637	3,637	-	3,305	0,014	4,628	4,628	-	3,857
	1	0,021	6,942				0,018	5,951			
10	2	0,022	7,273	6,942	0,331		0,03	9,918	8,485	2,20	
	3	0,02	6,612				0,029	9,587			

Fonte: Autora, 2020.

Tabela 13: Dados para análise do Etanol contido nos caldos semi- aberto e fechado.

Tempo (dias)	Amostra	SEMI-ABERTO			FECHADO		
		abs	Creal (g/L)	Cmédia (g/L)	abs	Creal (g/L)	Cmédia (g/L)
0	0	0,000	0,000	-	0,000	0,000	-
	1	0,003	0,32		0,01	1,066	
10	2	0,004	0,426	0,355±0,061	0,007	0,746	0,711±0,374
	3	0,003	0,320		0,003	0,320	

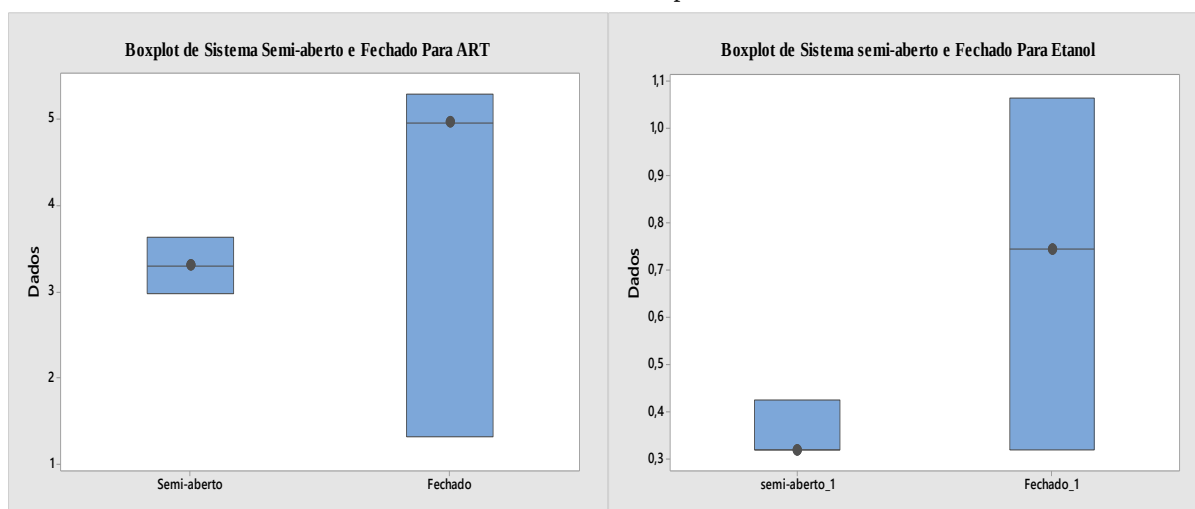
Fonte: Autora, 2020.

Gráfico 6: Semi- Aberto e Fechado versus Tempo.

Fonte: Autora, 2020.

Gráfico 7: Comparação das Concentrações de Etanol e ART em Sistemas Semi-aberto e Fechado.

- (a) Boxplot das concentrações de ART das réplicas para Sistemas Semi-aberto e Fechado. (b) Boxplot das concentrações de Etanol das réplicas para Sistemas Semi-aberto e Fechado.



Fonte: Autora, 2020.

De acordo com a Tabela 12 houve maior produção média de ART nos ensaios fechados, considerado em ter quantidade limitada de oxigênio disponível, com 3,857 g/L de ART, 16,70% a mais que nos semi-abertos. Também pode ser visto no Gráfico 5a, pela reta tendo maior inclinação (coeficiente angular). Em relação ao teor de etanol, a Tabela 13 mostra uma produção média de etanol de 0,711 g/L, nos ensaios fechados, quase 2 vezes maior que nos semi-aberto. Também pode ser visto em boxplot (Gráfico 7) que tanto as concentrações de ART quanto de etanol no sistema fechado são maiores que no semi-aberto, pois os valores

das médias e medianas encontram-se na posição superior, no entanto, as caixas tem maior amplitude que as do semi-aberto (caixas mais compactas), mostrando ser mais imprevisível.

Da mesma forma feita nos itens anteriores, foi feita ANOVA tratando os dados de ART e etanol, e verificar estatisticamente se são diferentes. Nas Tabelas 14 e 15 encontram-se a ANOVA para as concentrações de ART e etanol para os dois sistemas estudados, respectivamente.

Tabela 14: Análise de variância (ANOVA) das concentrações de ART das réplicas para Sistemas Semi-aberto e Fechado.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,4571	1	0,4571	0,1845	0,6896	7,7086
Dentro dos grupos	9,9075	4	2,4769			
Total	10,3646	5				

Fonte: Autora, 2020.

Tabela 15: Análise de Variância (ANOVA) das Concentrações de Etanol das réplicas para Sistemas Semi-aberto e Fechado.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,1893927	1	0,1893927	2,6339168	0,1799245	7,7086474
Dentro dos grupos	0,2876213	4	0,0719053			
Total	0,477014	5				

Fonte: Autora, 2020.

De acordo com as Tabelas 14 e 15, mostram que os dois sistemas dos experimentos semi-aberto e fechado, são significativamente equivalentes. Provavelmente, a quantidade de oxigênio disponível nos erlenmeyers (250 mL), com volume de 100 mL de meio, no sistema fechado (lacrado) é grande suficiente para não diferenciar as culturas com *Botrytis sp* em sistema semi-aberto (utilizando chumaço de algodão na abertura do erlenmeyer).

A Tabela 16 expõe o rendimento de hidrólise (RH), rendimento de fermentação (RF), produtividade de etanol (PrE) e o teor alcoólico em v/v, os cálculos foram feitos da mesma forma do item anterior.

Tabela 16: Avaliação dos Rendimentos de hidrólise e fermentação, produtividade e teor alcoólico para com e sem suplementação.

	RH(%)	RF(%)	PrE (g/L.dia)	v/v (%)
Aberto	18,00	19,11	0,036	0,045
Fechado	23,61	30,03	0,071	0,090

Fonte: Autora, 2020.

Como já discutido, os rendimentos apresentados na Tabela 16, confirma que no sistema fechado nas culturas com *Botrytis sp* obteve maiores valores, principalmente para hidrólise (30%), no entanto, em termos de concentração mostrou-se ser imprevisível, contudo, estatisticamente, os dois sistemas são significativamente iguais. Portanto, precisaria de mais experimentos, utilizando sucessivamente frascos de volumes cada vez menores utilizando o mesmo volume de meio até que existam diferença significativa nos sistemas semi-aberto e fechado.

5.3.1.1 Avaliação da Produção de Etanol com uma Segunda Fermentação do Caldo da Cultura com Levedura comercial

O Caldo da Cultura do *Botrytis sp* em meio BP após os 10 dias de cultivo dos itens anteriores apresentou-se ter carboidratos fermentescíveis disponíveis no meio, ele então passou a ser chamado de caldo hidrolisado fermentado, este caldo foi então submetido a uma segunda fermentação com a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, sendo esta utilizada em diversos processos industriais na elaboração de produtos fermentativos, este procedimento foi feito afim de avaliar a possibilidade de um segundo sistema e aumentar o teor alcoólico deste processo.

Assim sendo, a Tabela 17 apresenta os dados obtidos pela curva padrão da concentração de etanol a partir da leitura do espectrofotômetro para o etanol contido nas amostras do caldo após uma segunda fermentação com a levedura por 48h á 35°C, sem agitação, de todos os caldos hidrolisados fermentados dos experimentos anteriores. Os valores apresentados correspondem à média das concentrações de etanol de 3 ensaios (réplicas) realizados de forma independentes nas mesmas condições. Também contém o rendimento de fermentação calculado em relação ao ART inicial, ou seja, o ART residual que consistia no caldo antes da adição da levedura.

Tabela 17: Dados do teor alcoólico, do Rendimento de fermentação e produtividade para uma 2ª Fermentação com levedura.

CULTURAS COM LEVEDURA <i>S.cerevisiae</i>									
	Amostra	abs	Creal (g/L)	Cmédia (g/L)	Desvio Padrão	Tempo (h)	v/v (%)	PrE (g/L.h)	RF (%)
ABERTO/COM SAIS	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	0,016	1,705			48			
	2	0,029	3,090	2,167	0,800	48	0,27	0,045	62,05
	3	0,016	1,705			48			
ABERTO/SEM SAIS	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	0,027	2,877			48			
	2	0,031	3,303	3,268	0,374	48	0,41	0,068	95,52
	3	0,034	3,623			48			
FECHADO/SEM SAIS	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	0,031	3,303			48			
	2	0,033	3,516	3,658	0,443	48	0,46	0,076	84,37
	3	0,039	4,155			48			

Fonte: Autora, 2020.

Nota: A PrE foi feita apenas em relação a 2ª fermentação.

De acordo com a Tabela 17 o maior RF (%) foi no caldo derivado do cultivo do *Botrytis sp* em sistema “semi-aberto e sem a suplementação de sais”, com 95,52%, sendo um ótimo rendimento, muito acima do teórico, apesar da concentração de etanol ser menor (com 3,268 g/L) que no caldo derivado do “sistema fechado e sem sais” (com 3,658 g/L), isto pode ser explicado da possibilidade da liberação de algum composto no caldo hidrolisado fermentado do sistema fechado pelo fungo *Botrytis sp* que prejudicou a fermentação pela levedura *S. cerevisiae*. O aumento da concentração de etanol com uma segunda fermentação foi de 6,8 vezes maior para semi-aberto com sais, 9,2 vezes maior para o semi-aberto sem sais e 5,1 vezes maior no fechado. Isto significa que é possível aumentar o teor alcoólico das culturas utilizando os açúcares fermentescíveis que não foram utilizados pelo fungo com uma segunda fermentação com a levedura. Além disso, tanto “fechado/sem sais” quanto “semi-aberto/sem sais” obtiveram maior concentração de etanol no final da 2ª fermentação em comparação com trabalho de Siqueira (2016) com $3,19 \pm 0,48$.

Na Tabela 18 contém os dados da ANOVA para os sistemas com a 2ª fermentação. Pode-se observar que existe diferença significativamente entre os 3 sistemas ($F > F_{crítico}$; valor- $P < 0,05$) com 95% de confiabilidade.

Tabela 18: Análise de variância (ANOVA) das concentrações de etanol das réplicas para os sistemas com 2ª fermentação.

Fonte da variação	SQ	GI	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	3,5886362	2	1,7943181	5,5149115	0,0437344	5,1432528
Dentro dos grupos	1,9521453	6	0,3253576			
Total	5,5407816	8				

Fonte: Autora, 2020.

Como são 3 sistemas, por ANOVA não se pode dizer qual ou quais são diferentes, logo, fez-se um método de comparação, método de Tukey, que está descrito na Tabela 19.

Tabela 19: Método de Tukey Para Comparação dos Sistemas com 2ª fermentação.

Fator	N	Média	Agrupamento	
FECHADO/ SEM SAIS	3	3,658	A	
ABERTO/SEM SAIS	3	3,268	A	B
ABERTO/ COM SAIS	3	2,167		B

Fonte: Autora, 2020.

No método de Tukey médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes. Logo, estatisticamente, fechado sem sais e aberto com sais são significativamente diferentes.

5.3.2 Influência do Aumento da Temperatura na Produção de Etanol com *Botrytis sp*

A temperatura é muito importante, tanto na hidrólise quanto na fermentação, como também para outras atividades metabólicas do microrganismo. As temperaturas ótimas para hidrólise são 45-50 °C e fermentação 30-37 °C (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996). Desta forma, foi feito um experimento para efeito de comparação do cultivo fechado à 35 °C, 160 rpm com o cultivo fechado à temperatura ambiente na mesma rotação e em meio BP com o *Botrytis sp*. Desta forma, a Tabela 20 apresenta os dados da concentração de etanol à 35 e à temperatura ambiente contidos nas amostras do meio de cultura BP em triplicatas após 10 dias de cultivo.

Tabela 20: Dados do teor alcoólico e produtividade para a Influência da Temperatura na Cultura com *Botrytis sp.*

	Amostras	Abs	Creal (g/L)	Cmédia (g/L)	Desvio Padrão	Tempo (dia)	v/v (%)	PrE (g/L.dia)
Temp. Ambiente (23-28°C)	0	0	0	-	-	0	-	-
	1	0,01	1,066			10		
	2	0,007	0,746	0,711	0,306	10	0,09	0,071
	3	0,003	0,32			10		
	0	-0,005	-0,533	-	-	0		
Temp. à 35°C	1	0,029	3,09			10		
	2	0,025	2,664	2,841	0,181	10	0,36	0,284
	3	0,026	2,77			10		

Fonte: Autora, 2020.

Nota-se pela Tabela 20 que há uma grande influência da temperatura na produção de etanol na cultura com *Botrytis sp.* No cultivo à 35° C o fungo produziu 2,8 g/L, quase 4 vezes maior que à temperatura ambiente, com 0,711 g/L. Além disso, foi maior que na segunda fermentação com levedura *S. cerevisiae* do caldo hidrolisado fermentado “semi-aberto com sais”, 2,17 g/L, do item anterior. Logo, nestas condições de cultivo foi muito promissor no sistema BCP com o *Botrytis sp.*

Na Tabela 21 contém os dados para ANOVA dos dois experimentos.

Tabela 21: Análise de variância (ANOVA) das concentrações de etanol das réplicas para as temperaturas.

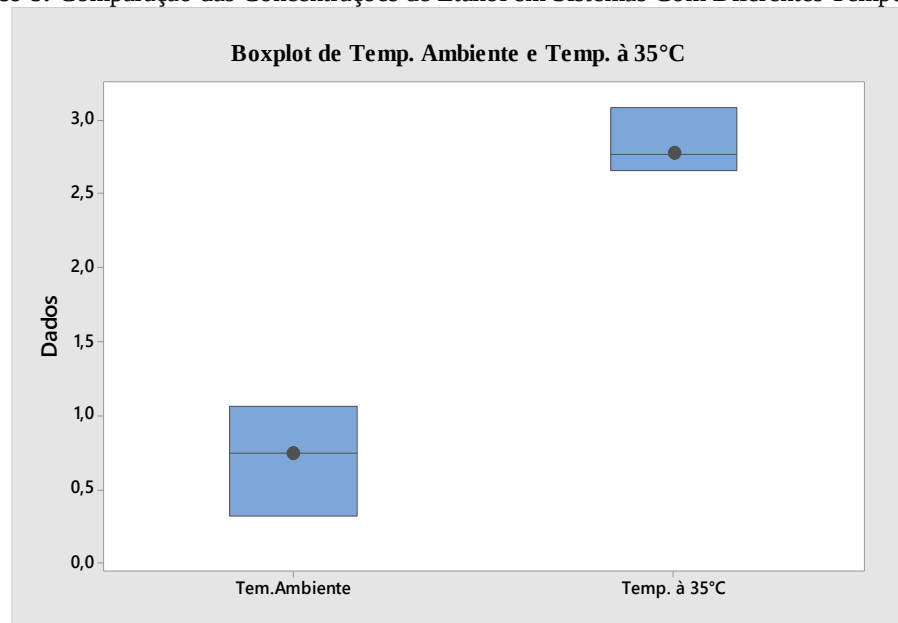
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	6,8096107	1	6,8096107	71,963928	0,0010586	7,7086474
Dentro dos grupos	0,3785013	4	0,0946253			
Total	7,188112	5				

Fonte: Autora, 2020.

Desta forma, mostra estatisticamente por ANOVA na Tabela 21 que os dois sistemas são significativamente distintos.

No Gráfico 8 mostra o boxplot do experimento à 35°C é mais achatado, o que indica uma baixa variabilidade e desvio padrão. Além disso, ele está posicionado na parte superior da tela, ou seja, a média e o valor mediano são valores bem mais elevados.

Gráfico 8: Comparação das Concentrações de Etanol em Sistemas Com Diferentes Temperaturas.



Fonte: Autora, 2020.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho tornou possível o conhecimento e a possibilidade do bioprocesso consolidado para produção de etanol de segunda geração utilizando um fungo filamentoso, *Botrytis sp*, barateando o processo e podendo trazer benefícios para o setor energético do país.

-O fungo *Botrytis sp* cresce rapidamente em placas de Petri, meio BDA, em até 16 dias. E em meio BP ele cresce e produz etanol celulósico em maior concentração em 4 semanas de cultivo. O caldo da batata inglesa contém sais e carboidratos necessários para o microrganismo, porém, é possível que o carboidrato presente, possa prejudicar o processo para obtenção do etanol.

-O sistema mais estável com maior produção de etanol das culturas do fungo *Botrytis sp* foi à temperatura de 35°C, 160 rpm e em hipóxia, conquistando um teor alcoólico de 2,841 g/L.

-O *Botrytis sp* consegue hidrolisar a celulose presente, liberando os açúcares fermentescíveis no meio e produzindo etanol, contudo, a fermentação é muito lenta, necessitando de uma segunda fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Este trabalho mostrou ser possível esta configuração. Em termos de maior concentração de etanol, o melhor sistema seria utilizando uma segunda fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (à 35 °C, sem agitação, fechado) do caldo hidrolisado fermentado da cultura BP “sem sais, fechado” do *Botrytis sp* (temperatura ambiente e 160 rpm). Em termos do maior rendimento de fermentação o melhor sistema seria utilizando uma segunda fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (à 35 °C, sem agitação, fechado) do caldo hidrolisado fermentado da cultura BP “sem sais, semi-aberto” do *Botrytis sp* (à temperatura ambiente e 160 rpm).

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO (ANP). **Produção de biocombustíveis**. RenovaBio. Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/renovabio>>. Acesso em: Maio de 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA (ANEEL). 2009. Disponível em: <www.aneel.gov.br>.

ALENCAR, B. R. A; GOUVEIA, E. R. Produção de etanol de hidrolisado enzimático de papel de escritório descartado. In: **XXIII Conic, VII Coniti, IV Enic da UFPE**. UFPE. PE, 2015. Disponível em: <https://www.ufpe.br/documents/616030/926763/Producao_de_etanol_de_hidro.pdf/ed1efde4-79e4-4bcc-a195-0f9786a1ce04> Acesso em: Set. de 2020.

ALMEIDA, R.M. R.G; SILVA, J. J.B (Coord). **Notas de aula: laboratório de engenharia química II**. Universidade Federal de Alagoas. Maceió, AL, 2015.

ALVES, J. M. B.; MACRI, R. C. V. Etanol de segunda geração: estudo de materiais lignocelulósicos e aplicações da lignina. **Ciência & Tecnologia**. v. 5, n. 1. Fatec Nilo de Stéfani – Jaboticabal, 2013.

ARAÚJO, C. R; GARRIDO, C. V. S; SANTOS, J. M. G. M; LEAL, S. C. S; CAMPOS, L. M. A. Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos. **Revista Eletrônica SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica**, UNIFACS, Salvador, BA v. 12, 2013.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: I. S. MELO; J. L. AZEVEDO. (Org.). **Ecologia Microbiana**. 1 ed. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, 1998, v. 1, p. 117-137.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnol Adv**, n. 1, v. 26, p. 89-105, 2008.

BISARIA, V. S; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 3, p. 90-104, 1984.

BNDES; CGEE. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável / organização. BNDES e CGEE. ed, Rio de Janeiro: **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social**, 2008.

BROWN, L. M.; HAWKINS, G. M.; DORAN-PETERSON, J.; LOVE, J.; BRYANT, J. A. Ethanol Production from Renewable Lignocellulosic Biomass. **Biofuels and Bioenergy**, 89-104, 2017.

BRONZATO, G. R. F. **Investigação da biomassa de *Eichhornia crassipes* (aguapé) para a obtenção de etanol de segunda geração como um processo mitigatório da poluição aquática**. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia e Área de Concentração em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista, Botucatu - SP, 2016.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P & D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010.

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

CARVALHO, M. Lucas de. **Estudo cinético da Hidrólise Enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CASTRO, A. M. ; PEREIRA, J. N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo: 2010, n. 1, v. 33, p.181-188.

COSTA, R.C.; SODRÉ, J.R. Hydrous ethanol vs. gasoline–ethanol blend: engine performance and emissions. **Fuel**, 2010, 89: 287–293.

DELLA-BIANCA, B. E. ; BASSO, T. O. ; STAMBUK, B. U.; BASSO, L.C.; GOMBERT, A.K. What do we know about the yeast stains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2013, 97(3): p. 979-991.

DIAS, M.O.S.; JUNQUEIRA, T.L.; JESUS, C.D.F.; ROSSEL, C.E.V.; MACIEL, R.M.; BONOMI, A. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. **Energy**, 2012, 43:246-252.

EMBRAPA. Plano Nacional de Agroenergia 2006 - 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Produção e Agroenergia. 2. ed. **rev. Brasília**, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 110 p. 2006.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE). **Balanço Energético Nacional**. 2018. Relatório Síntese – Ano Base 2017. Disponível em <www.epe.gov.br> Acesso em: Abril de 2020.

FENGEL, D.; WEGENER, G.. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989.

GALDINO, K.C.A. **Isolamento E Identificação De *Botrytis Sp.* Como Fungo Endofítico De Pau-Brasil – *Caesalpinia echinata Lam.***, Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL, 2012.

GERAQUE, E. Brasil terá centro para álcool celulose. **Folha de São Paulo**, 2009. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/ambiente/ult10007u579838.shtml>>. Acesso em: out. de 2019.

GHOSH, P.; GHOSE, T. K. Em **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**; Scheper, T., ed.; Springer: New York, 2003, vol. 85.

GILIO, L. Análise dos impactos socioeconômicos da expansão do setor sucroenergético. Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

GODOY, S. G. M. **O protocolo de Kyoto e o mecanismo de desenvolvimento limpo: uma avaliação de suas possibilidades e limites**. 2005. 192 f. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade e Meio Ambiente). Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, p. 151, 2005.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAALJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, n. 28, p.384-410, 2005.

JEFFRIES, T.W. Engineering yeast for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, 2006, 17: 320-326.

KHEZAMI, L.; CHETOUANI, A.; TAOUK, B.; CAPART, R. Production and characterisation of activated carbon from wood components in powder: cellulose, lignin, xylan. **Powder Technology**, 2005, v. 157, p. 48-56.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J.; JR,M.J.A.; LYND, L.R. Comparison of liquid hot water and steam pretreatment of sugarcane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, 2002, v. 81, p. 33-44.

LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. **Bioresource Technology**, v. 165, n. C, p. 3–8, 2014.

LIMA, B. M.; CAMARGO, L. E. A. **Biocombustível & biotecnologia**: etanol celulósico. In: SEMINÁRIO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2009, Piracicaba. [Trabalho apresentado...]. Piracicaba, ESALQ/USP, 2009.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. 2001, v.3, p. 616.

LU, J.; LI, X. Z. ; ZHAO, J.; QU, Y. Enzymatic Saccharification and Ethanol Fermentation of Reed Pretreated with Liquid Hot Water. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2013, v.144, p.539-547.

LU, J.; SHEAHAN, C.; FU, P. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. **Energy Environ. Sci.**, v. 4, n. 7, p. 2451–2466, 2011.

LYND, L.R. ; VAN ZYL, W.H. ; MCBRIDE, J.E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Curr Opin Biotechnol.** 16(5),p.577-83, Out de 2005.

MAEDA, R. N. **Produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração.** Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MAEDA, R. N.; SERPA, V. I; ROCHAA, V. A. L; MESQUITA, R. A. A; ANNAC, L. M. M. S; CASTRO, A. M; DRIEMEIER, C. E; PEREIRA JR, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic

hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 5, p.1196-1201, 2011.

MAIA, L. C.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Os fungos do Brasil. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, v. 1, p. 43–48, 2010.

MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **J Bacteriol.** 73(2):269-78, 1957.

MANDELS M, REESE ET. Indução de celulase em fungos pela celobiose. **J Bacteriol** . 79 (6): 816-826, 1960.

MANDELS, M; WEBER, J. Production of cellulases. **Adv. Chem.** Ser. Vol. 95, p. 391-414. 1969.

MAPA. Fixa o percentual obrigatório de adição de etanol anidro combustível à gasolina. Portaria n. 105, 28 de fevereiro de 2013. **Governo Federal- Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**. Disponível em:<www.gov.br/agricultura/pt-br> . Acesso em: Maio de 2020.

MAPA. Fixa o percentual obrigatório de adição de etanol anidro combustível à gasolina. Portaria n. 75, 05 de março de 2015. **Governo Federal- Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**. Disponível em:<www.gov.br/agricultura/pt-br>. Acesso em: Maio de 2020.

MARQUES, F. Uma transição será suave. **Pesquisa Fapesp**, n.163, p.21-25, 2009. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/a-transicao-sera-suave/>>. Acesso em: Set. de 2020.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). Balanço Energético Nacional (BEN). Brasília, 2007.

MORANDI, M. A. B; MAFFIA, L. A. Manejo Integrado do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*. **Embrapa Meio Ambiente**. n44 Jaguariúna, SP. 2005.

MOTA, F. A. S; VIEGAS, R. A. ; LIMA, A. A.S; SANTOS, F. F. P; CASELLI, F.T.R. Pirólise da biomassa lignocelulósica: uma revisão. **Revista GEINTEC**. Vol. 5/n. 4/ p.2511-2525. São Cristóvão – SE, 2015.

MURRAY, D. Ethanol's Potential: Looking Beyond Corn. Atualizações de eco-economia. Earth Policy Institute, Washington, DC, EUA, 2005. Disponível em: <www.earth-policy.org/Updates/2005/Update49.htm>. Acesso em: Abril 2020.

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Químicos). UFSCAR. CCET - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia. EQ, UFSCar, São Carlos, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. A Glicólise e o Catabolismo das Hexoses. In: WH FREEMAN AND COMPANY (Ed.). **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3 ed. New York. p. 409–440, 2013.

NGUYEN, Q. A. Economic analysis of integrating a biomass to ethanol plant into a pulp/saw mill. **Bioconversion of forest and agricultural residues**, p. 321-340, 1993.

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

OWEN, N. L.; HUNDLEY, N. Endophytes - the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**, v. 87, n. 2, p. 79-99, 2004.

PANDEY, A.; SOCCOL, CR; NIGAM, P; SOCCOL, V.T. Potencial biotecnológico de resíduos agroindustriais. I: bagaço de cana. **Bioresource Technology**, 74 (1), 69–80, 2000.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant Journal**, v. 54, p. 559-568, 2008.

PEREIRA, D. G. S. **Rendimentos da hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon, capimmombaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2013.

PINTO JR., H. Q. (Orgs.); ALMEIDA, E. L. F. ; BOMTEMPO, J. V. ; IOOTTY, M. ; BICALHO, R. G. Economia da energia: fundamentos econômicos, evolução histórica e organização industrial. 1. Ed, p.416. Rio de Janeiro: Campus, 2007.

PISSINATO, B. **A cultura de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo entre 1950 e 2010: evolução histórica da área e da produtividade**. Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

PORTO, L.M. **Modelagem de processo Industrial de Fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série**. 2005. 139 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R.E.; MARTÍNEZ-ANAYA, C.; CUERVO-SOTO, L.I.; SEGOVIA, L.; FOLCH-MALLOL, J.L. Loosenin, a novel protein with cellulose disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. **Microbial Cell Factories**. vol. 10, p. 8, 2011.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, 1(3). Retrieved August 28, 2001. ISSN 0717-3458.1998.

RANA, V.; ECKARD, A.D.; TELLER, P.; AHRING, B. K. On-site enzymes produced from *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus saccharolyticus* for hydrolysis of wet exploded corn stover and loblolly pine. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 282– 289, 2014.

RECICLASAMPA. História e reciclagem de papel: entenda o processo e como fazer. SP. 2018. Disponível em: < <https://www.reciclasampa.com.br/artigo> >. Acesso em: Set. de 2020.

ROCHA, G.J.M; MARTÍN, C.; SOARES, I. B.; SOUTO-MAIOR, A. M; BAUDEL, H. M; ABREU, C. A. M. Diluted mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

ROMERO, T. Etanol Global: O Brasil será referência em estudo para o uso mundial do etanol. **Inovação Tecnológica**. São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias.php?artigo=etanol-global-brasilreferencia-estudo-uso-mundial-etanol>>. Acesso em: Out. de 2019.

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Rev. BNDES**. p. 117 – 156. 2009. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/10017/1/RB%2032%20O%20etanol%20de%20segunda%20gera%C3%A7%C3%A3o_limites%20e%20oportunidades_P_BD.pdf> . Acesso em: Maio de 2020.

SANTOS, D. S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica.** 2012. 218 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro - RJ, 2012.

SANTOS, F.A; QUEIRÓZ, J.H; COLODETTE, J. L; FERNANDES, S. A; GUIMARÃES, V.M; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, vol. XY, Nº.00, 1-7, 2012;

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKA, K. **Bioethanol production from agricultural wastes: An overview.** **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p.19-27, 2012.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SENE, E. ; MOREIRA, J. C. **Geografia Geral e do Brasil:** Espaço Geográfico e Globalização. 4.Ed. São Paulo. Editora Scipione. 2010

SEVERO, J.R. O álcool, o Brasil e o mundo. **CNA. Informe.** 2006.

SILVA, A. A. S. E. **Efeito dos Diferentes Métodos de Tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar na Obtenção de Açúcares Fermentáveis por Conversão Enzimática.** 2008. 33p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial). Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA/Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

SILVA, R. ; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C. ; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1436–1441, 2009.

SILVA, T. P; ALBUQUERQUE, F. S; SANTOS, C. W. V; FRANCO, M; CAETANO, L. C; PEREIRA, H. J. V. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. **Bioresource Technology**. V. 270, 263-269, 2018.

SILVA, F. V. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. **Rev. Liberato**, Novo Hamburgo, v. 13, n. 20, p. 01-16, jul./dez de 2012.

SILVESTRIN, C. R. **Bioeletricidade: Reduzindo Emissões e Agregando Valor ao Sistema Elétrico Nacional**. PALESTRA DO Ethanol Summit 2009. São Paulo. 2009

SINGHANIA, R. R. SUKUMARAN, R. K. ; PATEL, A. K. ; LARROCHE, C. ; ASHOK PANDEY. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SIQUEIRA, L.N; GUARDA,E.A; GUARDA,P.M; SILVA,R.B.R; BARBOSA, R.S. Rendimento de hidrólise e produção de etanol lignocelulósico a partir de biomassa de capim elefante. **J. Bioen. Food Sci.**, v.3, n.4, p.191-196, 2016.

SIVERS, M. V., ZACCHI, G. A. Technoeconomical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 43-52, 1995.

SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. **Conversão de celulose pela tecnologia Organosolv**. São Paulo: NAIPPE - USP, 2007. (Nova Série, v. 3). Disponível em: <http://www.naippe.fm.usp.br/arquivos/livros/Livro_Naippe_Vol3.pdf>. Acesso em: Set. de 2020.

SUN S.; SUN S.; CAO X.; SUN R. O papel do pré-tratamento na melhoria da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. **Bioresource Technology**. Janeiro de 2016; 199: 49-58. DOI: 10.1016 / j.biortech.2015.08.061.

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

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v.10, n. 5/6, p.367-375, 1996.

TÍMÁR-BALÁZSY, A; EASTOP, D. **Chemical principles of textile conservation**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1998. 444 p.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2012. 934p.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO (UNICA). **Anais oficiais do Ethanol Summit 2009**. São Paulo: Jun. 2009.

UNITED STATES OF AMERICA DEPARTMENT OF ENERGY. **Office of Science. Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol: a joint research agenda.** Washington, DC, 2006. (DOE/SC-0095).

VÁSQUEZ, M. P. **Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar.** 2007. 205 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pósgraduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em <<http://tpqb.eq.ufrj.br/download/hidrolise-enzimatica-e-fermentacao-simultaneas-para-producao-de-etanol.pdf>>. Acesso em set. de 2020.

VENTURINI F, W.G.; **Tecnologia de bebidas.** Ed. Edgard Blücher, 2005, p.525.

VERHOEFF, K. Introduction. In *Recent Advances in Botrytis Research* (ed. K. Verhoeff, N. E. Malathrakis & B. Williamson), pp. 2–4. **Pudoc Scientific Publishers** : Wageningen, The Netherlands. 1992.

VEROTTI, A. Do etanol ao açúcar. **União Nacional da Bioenergia (UDOP).** Araçatuba-SP, 09 de Jun. de 2020. Disponível em: <https://www.udop.com.br/noticia/2020/06/09/do-etanol-ao-acucar.html>>. Acesso em: Set. de 2020.

VICCINI, G. Otimização da Produção de Esporos do Fungo *Clonostachys rosea* – um Biopesticida Para a Cultura do Morangueiro (Tese de Mestrado). Paraná, PR. 2004.

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

ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A., BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renew Sust Energ Rev.**2017, 71, 475.

ZAMORA, F. Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In: V. Moreno-Arribas, & C. Polo (Eds.), **Wine Chemistry and Biochemistry**. Vol. Capítulo 1, pp. 3-26, 2009.

ZANCHETTA, A. Celulases e suas aplicações. **Mundo das Leveduras.** UNESP: Rio Claro, 2013.

ZHANG, PERCIVAL Y.-H.; HIMMEL, MICHAEL E.; MIELENZ, JONATHAN R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, **Biotechnology Advances**, v. 24, 2006, p. 452-481.

ZUANAZZI, J.A.S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e Desenvolvimento Econômico. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1421-1428, 2010.