

UTILIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDO A DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL PELO PROCESSO SFS

P. V. F. DANTAS¹, L. P. DE SOUZA¹, A. DE A. GUILHERME¹, E. S. DOS SANTOS¹, F. A. N. FERNANDES², G. R. DE MACEDO¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal do Ceará - Departamento de Engenharia Química

Contato: alexandredearaujoguilherme@gmail.com

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo caracterizar o bagaço de cana-de-açúcar, submetido a diferentes pré-tratamentos, através da composição química e morfologia externa e comparar estes resultados com a produção de etanol pelo processo de Sacarificação e Fermentação Simultânea (SFS) avaliando, também, diferentes leveduras. De acordo com os resultados, foi possível observar que o bagaço pré-tratado com ácido e álcali foi o que mais favoreceu a remoção de hemicelulose e lignina e pelos resultados de morfologia foi possível observar diferentes formas de ação para os pré-tratamentos. O pré-tratamento ácido alcalino junto com a levedura *S. cerevisiae* PE-2 no processo SFS foi a combinação mais eficiente para a produção de etanol em batelada. Estes resultados são importantes para seleção do pré-tratamento e micro-organismo quando se pensa no estudo do processo SFS em biorreator e uma futura ampliação de escala.

1. INTRODUÇÃO

Os pré-tratamentos são utilizados para se aumentar a conversão do material lignocelulósico em açúcares redutores como celobiose e glicose através do processo de hidrólise enzimática. Eles atuam desestruturando a matriz lignocelulósica, reduzindo as quantidades de lignina e hemicelulose e modificando a estrutura cristalina da celulose de forma a deixá-la mais susceptível ao ataque enzimático (Silverstein *et al.*, 2007).

Pré-tratamentos ácidos envolvendo ácido sulfúrico, nítrico ou clorídrico podem solubilizar parte da hemicelulose expondo ainda mais a celulose ao ataque enzimático (Schell *et al.*, 2003). O pré-tratamento hidrotérmico da biomassa vegetal é baseado no uso de água (água líquida no reator de alta pressão ou vapor de água) e de calor (150 a 230°C). Este processo permite a obtenção de hidrolisados essencialmente derivados da hemicelulose e uma fração sólida composta de celulose e lignina. A vantagem deste tratamento é a prevenção da corrosão do equipamento observado na hidrólise ácida e na ausência de reciclagem e de neutralização do ácido utilizado, o que simplifica a condução do processo e a redução de compostos inibidores da hidrólise enzimática e da fermentação (Boussarsar *et al.*, 2009). Pré-tratamentos alcalinos se referem ao uso de soluções alcalinas como hidróxido de sódio, dentre outras, usadas basicamente para remover lignina e diminuir o grau de cristalinidade da

celulose (Chang e Holtzaple, 2000). Pré-tratamentos com peróxidos em pH alcalino aumentam a eficiência enzimática através da deslignificação oxidativa e diminuição da cristalinidade da celulose e diminui a formação de compostos inibidores da hidrólise enzimática e da fermentação (Gould, 1985).

A celulose pode ser hidrolisada a glicose, por um complexo enzimático denominado celulasas, podendo então ser fermentado para produzir etanol em um processo com duas etapas (Yang *et al.*, 2011). Entretanto, estes dois processos podem ser realizados em uma só etapa denominada de sacarificação e fermentação simultânea (SFS) objetivando redução de tempo e energia, diminuindo custos de processo (Vasquez *et al.*, 2007).

Este trabalho teve como objetivo caracterizar o bagaço de cana-de-açúcar, submetido a diferentes pré-tratamentos, através da composição química e morfologia externa e comparar estes resultados com a produção de etanol pelo processo de Sacarificação e Fermentação Simultânea (SFS) avaliando, também, diferentes leveduras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Enzimas, levedura e bagaço de cana-de-açúcar

As enzimas utilizadas neste trabalho foram (NS22086) correspondentes às celulasas cedidas pela Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). O substrato utilizado foi o bagaço de cana-de-açúcar cedido gentilmente pela Usina Estivas (Arês – RN, Brasil) e as leveduras utilizadas foram; *Saccharomyces cerevisiae* PE- 2 e *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (Basso *et al.*, 2008), *Kluyveromyces marxianus* CE025 (Rocha *et al.*, 2011) e *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907.

2.2 Estoque de leveduras, pré-inóculo e inóculo

As leveduras foram mantidas, durante os ensaios, a -20 °C em glicerol estéril segundo Silva *et al.*, (2008). Também foram mantidas em meio YEPD a 4 °C sendo este estoque renovado a cada dois meses.

Para a produção do pré-inóculo e inóculo foi utilizado o meio de cultura nas seguintes proporções: glicose (30,0 g/L), extrato de levedura (5,0 g/L), (NH₄)₂SO₄ (10,0 g/L), KH₂PO₄ (4,5 g/L), MgSO₄.7H₂O (1,0 g/L) e ZnSO₄ (0,65 g/L) para as leveduras *S. cerevisiae* PE-2, *S. cerevisiae* CAT-1 e *K. marxianus* ATCC 36907. Para este mesmo meio de cultura, não foi possível observar o crescimento da levedura *K. marxianus* CE025, então, outro meio de cultura foi utilizado segundo Rocha *et al.*, (2011) que continha a seguinte composição; glicose (20,0 g/L), extrato de levedura (10 g/L), uréia (0,4 g/L), KH₂PO₄ (1,2 g/L), NaH₂PO₄ (0,18 g/L).

Para o preparo do pré-inóculo foi utilizado Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio de cultura, sob agitação de 150 rpm, a 30 °C para as leveduras *S. cerevisiae* PE-2, *S. cerevisiae* CAT-1 e *K. marxianus* ATCC 36907 e 37 °C para a levedura *K. marxianus* CE025, (melhor temperatura de crescimento). Uma colônia da levedura, crescida em placa de Petri, foi transferida para os frascos de Erlenmeyers onde foi incubada por tempos determinados para cada levedura.

A partir do pré-inóculo, foi transferido 5 mL da suspensão celular para os meios de inóculo. As condições de processos foram iguais às do pré-inóculo com exceção de temperatura que foi de 35 °C para as *S. cerevisiae* PE-2, *S. cerevisiae* CAT-1, 37 °C para a *K. marxianus* CE025 e 43 °C para a *K. marxianus* ATCC 36907. A escolha da temperatura de inóculo foi baseada na temperatura dos estudos anteriores e visando temperaturas mais altas que podem favorecer o processo SFS. O tempo de inóculo foi padronizado para cada levedura. A determinação da biomassa celular para padronizar pré-inóculo e inóculo foi realizada fazendo-se uma correlação entre massa seca em g/L e ABS em espectrofotômetro.

2.3 Pré-tratamento no bagaço de cana

O pré-tratamento ácido alcalino (AA) foi realizado utilizando bagaço na quantidade de sólidos de 20% (p/v) imerso em uma solução de ácido sulfúrico 2% (v/v) submetido a uma temperatura de 121 °C por 30 minutos, segundo Guo *et al.*, (2009). Em seguida, a fração sólida foi lavada com água até o valor do pH ficar próximo ao pH da água de lavagem. Após o pré-tratamento ácido, o material foi submetido a um pré-tratamento alcalino para a deslignificação onde foi utilizada uma quantidade de 20% (p/v) do material sólido submerso em solução de hidróxido de sódio 4% (p/v) submetido a uma temperatura de 121 °C por 30 minutos, segundo Vasquez *et al.*, (2007). Em seguida, o pH foi corrigido para 7,0 utilizando ácido clorídrico para posterior lavagem. O pré-tratamento AA visa à remoção de parte da hemicelulose (Schell *et al.*, 2003), lignina e redução do grau de cristalinidade da celulose (Chang e Holtzaple, 2000). O bagaço de cana submetido ao pré-tratamento AA foi denominado de BAA.

O pré-tratamento hidrotérmico alcalino (HA) foi realizado em duas etapas, sendo a primeira etapa realizada em um reator de alta pressão (Reator Inox PARR 4520 – 1 L, Series 4520 Bench Top Reactors 1 L, Parr Instruments Company USA), 10% de sólidos, 100 rpm, 20 bar de pressão inicial com Nitrogênio, 170 °C de temperatura de processo chegando a 35 bar, tempo de subida da temperatura 40 minutos, tempo de processo 40 minutos e tempo de resfriamento 15 minutos. Esta etapa do processo visa à redução da hemicelulose (Boussarsar *et al.*, 2009). A segunda etapa consistiu em submeter o material a um pré-tratamento alcalino da mesma forma como foi realizado no pré-tratamento AA. O bagaço de cana submetido ao pré-tratamento HA foi denominado de BHA.

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio em pH alcalino (PHA) foi realizado utilizando 4% (p/v) de bagaço *in natura* imerso em uma solução de peróxido de hidrogênio a 7,35% (v/v), agitado a 100 rpm com agitador mecânico (mod TE – 139, Tecnal, São Paulo/Brasil), temperatura ambiente (28 °C), conforme Rabelo *et al.*, (2011). Entretanto, como a reação é exotérmica, foi detectado temperaturas de até 80°C durante o processo. O tempo de residência foi de 1 h. O pH da solução de peróxido de hidrogênio foi ajustado para 11,5 com hidróxido de sódio antes de entrar em contato com o bagaço de cana. Após o término da reação a fração líquida foi descartada e os sólidos lavado com água (Rabelo *et al.*, 2011). Este pré-tratamento visa à redução da lignina e redução do grau de cristalinidade da celulose (Chang e Holtzaple, 2000), entretanto não há uma grande remoção de hemicelulose, favorecendo uma maior recuperação da xilose para fermentações. O bagaço submetido ao pré-tratamento PHA foi denominado de BPHA.

O pré-tratamento alcalino (A) foi o realizado da mesma forma que a etapa alcalina do pré-tratamento AA e tem como objetivo a comparação com os outros processos realizados visando à redução de custo com reagentes e números de etapas. O bagaço de cana submetido ao pré-tratamento A foi denominado de BA.

2.4 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana *in natura* e pré-tratado foi caracterizado quanto às quantidades de celulose, hemicelulose, lignina total, cinzas, extrativos em solvente orgânicos e extrativos em água quente (100 °C). As quantificações de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas foram realizadas de acordo com Gouveia *et al.*, (2009). As determinações dos extrativos em solvente orgânico e em água quente foram realizadas segundo o NREL (National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado - USA), conforme Sluiter *et al.*, (2008). As quantificações dos açúcares, ácidos orgânicos, HMF, furfural e etanol foram feitas por CLAE usando a coluna Shim-pack SCR 101-H (SHIMADZU, Kyoto/Japão) a 65 °C e ácido sulfúrico 5 mM em água MiliQ (D7031, Barnstead EasyPure RF System – Iowa/EUA) como fase móvel, uma vazão de 0,6 mL/min e o índice de refração (RID-10A, SHIMADZU, Japão) como detector.

Também foi realizado um estudo de morfologia por MEV (Reiner, 2010) com objetivo avaliar a modificação externa dos bagaços após os pré-tratamentos realizados. A morfologia por MEV (Phillips XL-30 ESEM, USA) foi realizada no bagaço *in natura* e pré-tratado utilizando a voltagem de 20 kV e distância de trabalho de 10 mm, espessura do feixe de elétrons de 4,0, detector SE e metalizador (Bal-Tec SCD-005, USA). As amostras foram coladas em suporte especial e revestidas com ouro para evitar a carga eletrostática e para melhorar a resolução da imagem.

2.5 Estudo do processo SFS

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL e meio reacional contendo uma quantidade de bagaço correspondente a 6% de celulose como única fonte de carbono baseando-se em estudos anteriores. As temperaturas de processo foram escolhidas como as melhores para o rendimento em etanol, sendo 35 °C para as *S. cerevisiae* PE-2, *S. cerevisiae* CAT-1, 37 °C para a *K. marxianus* CE025 e 43 °C para a *K. marxianus* ATCC 36907 de acordo com teste anteriores. A agitação foi de 150 rpm e o meio de cultura utilizado para complementar à nutrição microbiana: extrato de levedura (4,0 g/L), (NH₄)₂SO₄ (2,0 g/L), KH₂PO₄ (2,0 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,75 g/L) para as leveduras *S. cerevisiae* PE-2, *S. cerevisiae* CAT-1 e *K. marxianus* ATCC 36907. Para a levedura *K. marxianus* CE025, foi utilizado o mesmo meio do preparo do inóculo. A quantidade de células iniciais foi de 0,5 g/L para todas as leveduras e as quantidades de enzimas inicial utilizadas foram de 15 FPU/g celulose de celulasas sem suplementação de β -glicosidase, de acordo com estudos anteriores. Os ensaios foram de 24 horas e amostras foram coletadas para análises de produção de etanol ao final do processo.

O objetivo desta etapa foi avaliar o desempenho das quatro leveduras na produção de etanol em cada pré-tratamento, uma vez que a estrutura do bagaço a ser hidrolisado é diferente, bem como a presença de inibidores no processo e suas concentrações. Para a comparação dos processos com diferentes bagaços pré-tratados e diferentes leveduras foi

calculado o rendimento global de etanol para a quantidade de bagaço de cana não tratado (Equações 1 e 2).

$$\text{Fração sólida} \left(\frac{g}{g \text{ material não tratado}} \right) = \frac{\text{Parte insolúvel (g)}}{\text{Material não tratado (g)}} \quad (1)$$

$$\text{Rendimento global em etanol} \left(\frac{g \text{ etanol}}{100g \text{ material não tratado}} \right) = \text{Fração sólida} \times \frac{\text{Etanol (g)}}{\text{Quantidade inicial de bagaço pré-tratado (g)}} \times 100$$

(2)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão os resultados da composição do bagaço de cana-de-açúcar na forma *in natura* (BI) e da fração sólida do bagaço submetido aos pré-tratamentos.

Tabela 1: Composição do bagaço de cana-de-açúcar na forma *in natura* e submetido aos diferentes pré-tratamentos (fração sólida em base seca).

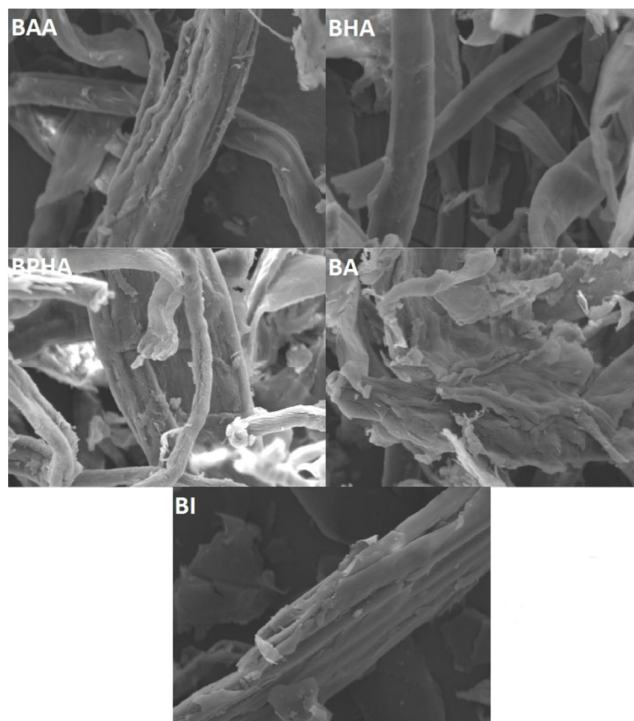
Componentes (%)	BI	BAA	BHA	BPHA	BA
Celulose	38,59±3,45	65,03±2,34	62,14±4,12	53,85±2,76	47,21±3,23
Hemicelulose	27,89±2,68	10,95±0,19	11,52±0,73	22,02±3,27	29,29±2,32
Lignina total	17,79±0,62	8,12±0,31	7,87±1,88	7,99±3,84	4,31±1,78
Extrativos em solvente orgânico	1,61±0,16	0,98±0,61	0,77±0,09	0,78±1,33	1,22±0,47
Extrativos em água quente	1,11±1,23	10,97±0,98	10,08±0,58	10,65±1,55	12,52±0,53
Cinzas	8,80±0,02	4,60±0,76	8,10±0,06	4,22±1,27	6,05±1,22

BI – bagaço *in natura*, BAA – bagaço submetido ao pré-tratamento ácido alcalino, BHA – bagaço submetido ao pré-tratamento hidrotérmico alcalino, BPHA – bagaço submetido ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e BA – bagaço submetido ao pré-tratamento alcalino.

Para a quantidade de celulose observou-se um aumento de 68,51%, 61,02, 39,54 e 22,33% nos bagaços BAA, BHA, BPHA e BA respectivamente. A quantidade de hemicelulose reduziu em 60,73%, 58,69 e 21,04% nos bagaços BAA, BHA e BPHA respectivamente. Não foi observada uma redução significativa na hemicelulose no bagaço de cana BA. A lignina foi reduzida em 54,35, 55,76, 55,08 e 75,77% nos bagaços BAA, BHA, BPHA e BA respectivamente. Pode-se observar uma redução bastante elevada da lignina no bagaço BA quando comparado com as composições finais dos outros bagaços pré-tratados. Estes resultados estão em concordância com a literatura (Benko *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011; Asgher *et al.*, 2013; Rabelo *et al.*, 2011).

Na Figura 1 estão apresentados os resultados da análise de morfologia através de MEV dos bagaços pré-tratados e *in natura*. Pode-se observar uma semelhança entre os bagaços pré-tratados onde se removeu hemicelulose e lignina, no caso, BAA e BHA, nas suas morfologias externas. Por outro lado, para os bagaços onde se removeu apenas a lignina, BPHA e BA, a morfologia se apresentou de forma semelhante entre os dois e diferente dos outros pré-tratados. Este resultado indica uma ação diferente destes pré-tratamentos, bem como, uma diferente morfologia final quando se tem mais ou menos presença de lignina no bagaço pré-tratado. Ficou nítida também a diferença entre os bagaços pré-tratados, que apresentam uma

estrutura mais desorganizada, quando comparado com o bagaço *in natura*, que se apresenta com uma estrutura mais compacta.



BAA – bagaço submetido ao pré-tratamento ácido alcalino, BHA – bagaço submetido ao pré-tratamento hidrotérmico alcalino, BPHA – bagaço submetido ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, BA – bagaço submetido ao pré-tratamento alcalino e BI – bagaço *in natura*.

Figura 1. Morfologia dos bagaços pré-tratados e *in natura* através das análises de MEV.

Na Tabela 2 estão apresentados os tempos padronizados para os preparos de pré-inóculo e inóculo das quatro leveduras estudadas e suas respectivas concentrações ao final do tempo de inóculo.

Tabela 2. Tempos padronizados para preparo de pré-inóculo e inóculo e quantidade de células no tempo final do inóculo para as leveduras estudadas.

Levedura	Tempo do pré-inóculo (h)	Tempo de inóculo (h)	Células ao fim do inóculo (g/L)
<i>S. cerevisiae</i> PE-2	20	10	4,46
<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	20	12	4,52
<i>K. marxianus</i> CE025	23	14	5,35
<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	22	8	6,26

Os tempos de pré-inóculo e inóculo foram os tempos detectados como início da fase estacionária. Pode-se observar uma diferença de tempos de crescimento entre as diferentes

espécies, bem como, da mesma espécie, mas nas diferentes cepas. Desta forma, foi possível se trabalhar com o número de células mais viáveis possíveis em concentrações conhecidas.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados para a produção de etanol (rendimento global em etanol) onde se utilizou das quatro cepas de leveduras, *S. cerevisiae* PE-2, *S. cerevisiae* CAT-1, *K. marxianus* CE025 e *K. marxianus* ATCC 36907, nos quatro bagaço de cana pré-tratados.

Tabela 3. Resultados do processo SFS para cada levedura estudada e cada bagaço de cana pré-tratado.

Pré-tratamento	Levedura	Rendimento global em etanol (g etanol/100 g material não tratado)
Ácido alcalino	<i>S. cerevisiae</i> PE-2	4,94
	<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	3,64
	<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	4,16
	<i>K. marxianus</i> CE025	2,86
Hidrotérmico alcalino	<i>S. cerevisiae</i> PE-2	2,47
	<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	2,27
	<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	2,90
	<i>K. marxianus</i> CE025	1,15
Alcalino	<i>S. cerevisiae</i> PE-2	3,68
	<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	4,01
	<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	4,18
	<i>K. marxianus</i> CE025	3,02
Peróxido de hidrogênio	<i>S. cerevisiae</i> PE-2	2,73
	<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	2,52
	<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	3,15
	<i>K. marxianus</i> CE025	1,57

Pode-se observar que o bagaço ácido alcalino combinado foi o que mais favoreceu ao processo de produção de etanol seguido do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio. A levedura *K. marxianus* CE025 apresentou uma produção de etanol bem inferior às outras utilizadas em todos os bagaços pré-tratados. O bagaço hidrotérmico alcalino combinado foi o que menos favoreceu ao processo estudado. Nas condições aqui testadas, o processo que obteve melhor produção de etanol foi o com a levedura *S. cerevisiae* PE-2 utilizando o bagaço de cana submetido ao pré-tratamento ácido alcalino, e mesmo se trabalhando com temperaturas mais elevadas, no processo com a levedura *K. marxianus* ATCC 36907, não foi possível obter a mesma produção. Entretanto, a levedura *K. marxianus* ATCC 36907 apresentou um melhor rendimento global em etanol quando se utilizou os outros bagaços pré-tratados.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, é possível verificar que mesmo com todos os pré-tratamentos agindo de forma a desestruturar a estrutura do bagaço de cana, ao se usar esta matéria-prima como substrato para o processo SFS, os resultados são diversos para cada pré-tratamento e levedura utilizada e com a melhor condição aqui

encontrada, um estudo cinético em biorreator faz-se necessário para se otimizar este processo, dando continuidade ao desenvolvimento desta tecnologia.

5. REFERÊNCIAS

- ASGHER, M.; AHMAD, Z.; IQBAL, H. M. N. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. *Industrial Crops and Products*, v. 44, p. 488-495, 2013.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil, *FEMS Yeast Res*, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BENKO, Z.; SIIKA-AHOB, M.; VIKARI, L.; RECZEYA, K. Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb Technol*, v. 43, p. 109-114, 2008.
- BOUSSARSAR, H.; ROGE, B.; MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6537-6542, 2009.
- CHANG, V.; HOLTZAPPLE, M. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 84-86, p. 5-37, 2000.
- GOULD J. M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. *Biotechnol Bioeng*, v. 27, p. 225-231, 1985.
- GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Quim Nova*, v. 32, p. 1500-1503, 2009.
- GUO, G. L.; HSU, D. C.; CHEN, W. H.; CHEN, W.H.; HWANG, W. S. Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. *Enzyme Microb Technol*, v. 45, p. 80-87, 2009.
- RABELO, S. C.; FONSECA, N. A. A.; ANDRADE, R. R.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 2600-2607, 2011.
- REINER, L. *Scanning Electron Microscopy: physics of image Formation and Microanalysis*. New York, 2010.
- ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. *J Ind Microbiol Biotechnol*, (2011) v. 38, p.1099-1107, 2011.
- SHELL, D. J.; FARMER, J.; NEWMAN, M.; MCMILLAN, J. D. Dilutesulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor – investigation of yields, kinetics, and enzymatic digestibilities of solids. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 105, p. 69-85, 2003.
- SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a – 20 °C. *RBAC*, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.
- SILVA, V. F. N.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A.; GONCALVES, A. R.; ROCHA, G. J. M. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 38, p. 809-817, 2011.
- SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D. J. O. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresour Technol*, v. 98, p. 3000-3011, 2007.
- SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, L.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP), Technical Report, NREL, 2008. p. 12.

VASQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA, M. B. Jr.; PEREIRA, N. Jr. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 136-140, p. 141-154, 2007.

YANG, P.; GUO, L.; CHENG, S.; LOU, N.; LIN, J. Recombinant multi-functional cellulase activity in submerged fermentation of lignocellulosic wastes, *Renewable Energy*. v. 36, p. 3268-3272, 2011.