UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

JULIANA MARIA SAMPAIO FURLANI

Influência de compostos fenólicos na fermentação de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* de panificação e identificação de seus produtos de bioconversão

LORENA – SP

2014

JULIANA MARIA SAMPAIO FURLANI

Influência de compostos fenólicos na fermentação de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* de panificação e identificação de seus produtos de bioconversão

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial, na área de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Teixeira da Silva

Edição reimpressa e corrigida

LORENA – SP

Setembro, 2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na Publicação
Biblioteca "Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite"
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Furlani, Juliana Maria Sampaio
Influência de compostos fenólicos na fermentação de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* de panificação e identificação de seus produtos de bioconversão. / Juliana Maria Sampaio Furlani. - –ed. reimpr., corr.– 2014.

162 p.: il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2014.
Orientador: Flávio Teixeira da Silva

1.Inibidores químicos 2. Compostos fenólicos 3. Fermentação 4. *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. I. Título. II. Silva, Flávio Teixeira da, orient.

663.1 - CDU

Dedico este estudo aos meus pais,
Clodomir e Lucíula,
a quem eu agradeço a vida,
o exemplo de caráter, a confiança
e o estímulo para dar sempre o melhor de mim.

Dedico igualmente ao Ricardo, André e Catarina,
pelo companheirismo nesses anos de estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, presente em nossos corações, pela saúde que nos torna capazes de continuar, mesmo que por caminhos difíceis.

Agradeço à minha pequena família, à família da minha casa, àquela que me acompanhou de pertinho nesses anos: Ricardo, Catarina e André. Agradeço também à minha família que vive mais distante, por sempre estarem ao meu lado: meus pais, meus dois irmãos, meus sogros, minhas cunhadas e meus sobrinhos e sobrinhas, em especial à Mila, que nos alegra com sua presença.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Flávio Teixeira da Silva, pela confiança e pela orientação, assim como pela compreensão em alguns momentos delicados que envolveram o tempo em que trabalhamos juntos.

Aos técnicos que tanto me ajudaram, e que ao final se tornaram meus amigos: em especial quero agradecer à Lucinha, que acompanhou meu trabalho de perto, indo muito além do trabalho técnico, me acolhendo em todos os sentidos. Aos queridos Zé Moreira, Zé Cobrinha, Jussara e Cléber, não tenho palavras para agradecer tanto respeito e colaboração.

Aos professores da EEL, principalmente ao professor André Ferraz por suas aulas, pela exigência na leitura crítica dos artigos e pelo uso dos equipamentos em seu laboratório; e à professora Teresa Brasil, que esteve próxima e sempre disponível.

Aos colegas de laboratório e das aulas, meus amigos e amigas, cuja juventude me trouxe momentos tão felizes. Gustavo, Gabrielle, Marília, Karina, Jéssica, estudantes de iniciação científica que me acompanharam e me ajudaram muito! Aos colegas da pós: João Evandro, Germano, Lívia, Juliana Sundfeld, Carol, Fernanda, Davi, Erlon, Gina, Fernando, Omar, Thales, Dayelle, Bruno, Celso, Vítor, Paula, Serginho, Naila, Rafael, Daniela Cortez, João Paulo, Flávio Ferraz, Claudio Donato, Túlio, Levi e tantos outros!!! Citar as pessoas é sempre complicado, outros também compartilharam meu tempo de EEL e quero agradecer a todos, seja pela colaboração, seja pela companhia, seja pelos estímulos, mas principalmente pelo carinho com o qual sempre fui recebida.

Como por três anos eu ainda não residia nem em Lorena e nem em Itajubá, precisei de outra casa para morar. Agradeço a acolhida que tive da Ana Claudia,

com a qual morei por um ano, da Juliana Sundfeld e do Serginho, da Carol, da Lucinha e do Bombard e da Raquel.

Aos meus colegas e amigos da Unifei, que não me deixaram fraquejar: Ana Claudia, Bombard, Mikael, Denise, Maurício Santos, Maurício Saraiva, Demétrio, Agenor, Newton, Sandro, Geise, Milady, Márcia, Juliana, Guilherme e Maria Elena. Ao Flávio e à Daniela, meu agradecimento especial pela ajuda com os equipamentos. Ao Fred, pela ajuda com o abstract.

À Jane e ao Éder, que alegraram e contribuíram para a finalização deste estudo, inclusive assumindo minhas aulas por um tempo. Dívida eterna, de coração.

Meus agradecimentos aos funcionários da EEL, sem eles as coisas não andam... Joel, Regina Horta, Dora, Cida, André Silva, Valquíria, Nadir, Isnaldi, os funcionários da portaria, da limpeza, enfim, agradeço a todos que fazem do seu trabalho o melhor para que o nosso dia a dia seja mais leve.

Agradeço ainda ao Prof. Luiz Carlos Basso, pela doação da cepa da levedura, pelas instruções para o cultivo e pelas sugestões na qualificação. Ao final do trabalho, as análises realizadas no Instituto de Química da UNESP de Araraquara valorizaram muito o meu trabalho. Assim, quero agradecer à professora Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni, que de pronto cedeu o uso dos equipamentos e à Dra. Bianca Ferreira da Silva, pela realização das análises e pelas discussões científicas extremamente proveitosas para este estudo.

Por fim, agradeço à USP pelos conhecimentos que desenvolvi, à Capes, ao CNPq, à Fapemig e à Rede Mineira de Química pelo apoio financeiro. À Unifei, pela oportunidade de formação em serviço.

Memória
Carlos Drummond de Andrade

Amar o perdido
deixa confundido
este coração.

Nada pode o olvido
contra o sem sentido
apelo do Não.

As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão.

Mas as coisas findas,
muito mais que lindas,
essas ficarão.

RESUMO

FURLANI, J. M. S. **Influência de compostos fenólicos na fermentação de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* de panificação e identificação de seus produtos de bioconversão.** 2014. 162p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2014.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência de 8 compostos fenólicos de baixa massa molar, oriundos da degradação da lignina, sobre a fermentação de glicose a etanol, em meio semidefinido, utilizando-se as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e de panificação. Esses compostos são formados quando o bagaço de cana-de-açúcar é pré-tratado, por explosão a vapor. Assim, *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido cumárico e ácido ferúlico foram adicionados individualmente aos meios de fermentação. Objetivou-se, também, identificar e quantificar os produtos da bioconversão desses compostos pela *S. cerevisiae* PE-2, por cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas. Os resultados mostraram que o *p*-hidroxibenzaldeído e o ácido *p*-hidroxibenzoico não foram tóxicos para ambas as cepas. Para a cepa PE-2, o siringaldeído e os ácidos cumárico e ferúlico também não apresentaram toxicidade. No caso da *S. cerevisiae* de panificação, a vanilina, o siringaldeído e o ácido vanílico (1,0 $g.L^{-1}$) dificultaram o consumo de glicose, diminuíram a produtividade volumétrica (Q_p) e aumentaram o desvio de glicose para ácido acético. Vanilina (1,0 $g.L^{-1}$) aumentou o fator de conversão de glicose em células ($Y_{X/S}$). Os ácidos siríngico e ferúlico (1,0 $g.L^{-1}$) e o ácido cumárico (0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$) diminuíram $Y_{X/S}$ (~50%), aumentaram o desvio de glicose para glicerol, dificultaram o consumo de glicose e diminuíram Q_p, tendo os ácidos cumárico e ferúlico apresentado o maior efeito inibitório. Para a *S. cerevisiae* PE-2, a presença da vanilina provocou a queda de Q_p, devido à dificuldade inicial em consumir o substrato. Já os ácidos vanílico e siríngico foram bastante inibitórios, dificultando o consumo da glicose, diminuindo Q_p e aumentando os desvios de glicose para a produção de glicerol e ácido acético. Os ácidos cumárico e ferúlico aumentaram o $Y_{X/S}$ (~ 45 e 80%). Quanto à bioconversão dos compostos fenólicos pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, apenas os ácidos que apresentam carboxila benzílica (ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanílico e siríngico) não foram transformados. A cepa PE-2 transformou rapidamente os aldeídos, formando os respectivos ácidos e alcoóis (esses últimos, provavelmente, formados em maior extensão). Esta levedura também foi capaz de converter os ácidos cumárico e ferúlico, mas neste trabalho não foram identificados os produtos dessa transformação. Concluiu-se que os compostos afetaram mais a Q_p do que $Y_{X/S}$. O fator de conversão de glicose em etanol não foi afetado por nenhum dos compostos. Alguns provocaram um maior desvio de glicose para a formação de glicerol. O desvio de glicose para ácido acético, nos meios aos quais se adicionou os aldeídos, acompanhou a bioconversão dos mesmos em seu produto de redução, preferencialmente. Este trabalho confirmou os dados da literatura de que a inibição dos processos fermentativos não depende apenas da natureza do composto, mas também de sua concentração e do tipo de micro-organismo.

Palavras-chave: inibidores químicos, compostos fenólicos, fermentação, *Saccharomyces cerevisiae* PE-2.

ABSTRACT

FURLANI, J. M. S. **Influence of phenolic compounds in the fermentation of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 and baker´s yeast *Saccharomyces cerevisiae* and identification of its bioconversion products.** 2014. 162p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2014.

The main objective of the present work was to investigate the influence of eight low molecular weight phenolic compounds, obtained from lignin degradation, in the fermentation of glucose to ethanol using *S. cerevisiae* PE-2 and the baker's yeast *S. cerevisiae* in a semi-defined medium. These compounds are originated from the pretreated sugarcane bagasse by steam explosion. Thus, 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin, syringaldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, coumaric acid and ferulic acid were added separately in the fermentative media. Moreover, the bioconversion products of these molecules by *S. cerevisiae* were identified and quantified by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. These results indicated that 4-hydroxybenzaldehyde and 4-hydroxybenzoic acid were not toxic for both strain. Additionally, syringaldehyde and coumaric and ferulic acids were also not toxic for PE-2 strain. Vanillin, syringaldehyde and vanillic acid (at 1.0g.L^{-1}) made the glucose consumption slower, reduced the volumetric productivity (Qp), increased the deviation of glucose to produce acetic acid for the baker's yeast *S. cerevisiae* system. Vanillin (at 1.0 g.L^{-1}) increased the cellular mass yield. Syringic and ferulic acids (at 1.0g.L^{-1}) and coumaric acid (at 0.6 and 1.0 g.L^{-1}) highly inhibited the microbial growth (about 50 %), increased the deviation of glucose to produce the glycerol and made slower the glucose consumption, reducing Qp. Coumaric and ferulic acids were the greatest inhibitors compounds for the baker's yeast *S. cerevisiae*. For *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, the presence of vanillin led to a Qp reduction, based on the initial difficult in substrate consumption. Vanillic and syringic acids were extremely inhibitory, making difficult the glucose consumption, reducing Qp and increasing both, glycerol and acetic acid production by deviation of glucose. Coumaric and ferulic acids increased the cellular yield (about 48 and 80 %). Concerning the bioconvertion of the phenolic acids by *S. cerevisiae* PE-2, only those molecules presenting the benzilic carboxyl group (4-hydroxybenzoic, vanillic and syringic acids) did not reacted. In contrast, aldehydes were rapidly transformed into their respective acids and alcohols (being this last one probably formed in greater amount). *S. cerevisiae* PE-2 was also capable to convert coumaric and ferulic acids, however, herein none products were identified. Thus, the compounds most affect ethanol productivity than the cellular mass yield. The ethanol yield was not affected by any of the compounds. Some of them led to a greater glucose deviation to produce glycerol and acetic acid. This work confirmed previously data published in the literature indicating that the inhibition of fermentative process did not depend exclusively on the compounds, but also its concentration and microorganism type.

Keywords: chemical inhibitors, phenolic compounds, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* PE-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Fórmula estereoquímica da celulose. 30

Figura 2.2– Representação de uma xilana. 31

Figura 2.3 – Representação das unidades fenilpropano precursoras da lignina...32

Figura 2.4 – Modelo de uma estrutura para a lignina.....32

Figura 5.1 – Cinética da fermentação alcoólica de glicose pela levedura S. cerevisiae de panificação, na ausência dos compostos modelo. (a) crescimento microbiano (♦) e pH (+), (b) produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); (c) produção de glicerol (■). 59

Figura 5.2– Concentrações inicial e final (6 h) dos compostos modelo no meio de fermentação sem adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2.....80

Figura 5.3 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência dos compostos modelo. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (+), **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (**x**-tracejado). 82

Figura 5.4 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura S. cerevisiae PE-2, na ausência **(tracejado)** e presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de ***p*-hidroxibenzaldeído**; **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (**+**), **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (**x**).....85

Figura 5.5 – Concentração *p*-hidroxibenzaldeído (●) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e formação do ácido *p*-hidroxibenzoico (**x**). Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de *p*-hidroxibenzaldeído.....87

Figura 5.6 - TIC da amostra 14 (6 h de fermentação) no modo positivo, XIC de *m/z* 107,1, espectro de massas do pico em 3,5 min.....88

Figura 5.7 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência (tracejado) e presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de **vanilina**; **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (**+**); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (**x**). 92

Figura 5.8 – Aumento da concentração de ácido vanílico (x) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de vanilina.....95

Figura 5.9 - TIC da amostra 30 (6 h de fermentação) no modo positivo, XIC de *m/z* 137, espectro de massas da banda em 4,3 min.....96

Figura 5.10 – Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência (tracejado) e presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de **siringaldeído**. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (**+**); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (**x**). ...99

Figura 5.11 - Concentração de ácido siríngico formado (○) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de siringaldeído.....102

Figura 5.12 - TIC da amostra 41 (2 h de fermentação) no modo positivo, XIC de *m/z* 167, espectro de massas da banda em 4,8 min.....103

Figura 5.13 - Área do cromatograma em função do tempo, referente ao álcool siringílico (+) formado durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de siringaldeído. 104

Figura 5.14 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência (tracejado) e presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de **ácido *p*-hidroxibenzoico**. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (+); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (x). 107

Figura 5.15 - Concentração de ácido *p*-hidroxibenzoico (□) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido *p*-hidroxibenzoico. 109

Figura 5.16 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência (tracejado) e presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de **ácido vanílico**. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (**+**); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (**x**). 113

Figura 5.17 - Concentração de ácido vanílico (□) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido vanílico..... 116

Figura 5.18 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência (tracejado) e presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de **ácido siríngico**. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (+); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (x). 118

Figura 5.19 – Extrapolação da curva de consumo de glicose com a finalidade de estimar o tempo final da fermentação para o teste com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico. 120

Figura 5.20 - Concentração de ácido siríngico (□) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico. 122

Figura 5.21 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência **(tracejado)** e presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de **ácido cumárico**. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (+); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (x). 125

Figura 5.22 – Diminuição da concentração de ácido cumárico (□) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido cumárico. 127

Figura 5.23 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência **(tracejado)** e presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de **ácido ferúlico**. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (+); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (x). 130

Figura 5.24 - Concentração de ácido ferúlico (□) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido ferúlico. 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1– Resultados da glicose residual em massa e percentual, da concentração de etanol, dos rendimentos dos produtos (massa de células, glicerol, ácido acético e etanol) em relação à glicose consumida e da produtividade volumétrica de etanol. Valores calculados para o tempo de 6 h de fermentação, para o teste inicial sem adição dos compostos modelo. 61

Tabela 5.2 - Valores do pH para os testes Controle e respectivos testes com adição dos compostos modelo nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$.....63

Tabela 5.3 – Resultados para os experimentos sem e com adição de *p*-hidroxibenzaldeído nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação.....64

Tabela 5.4 – Resultados para os experimentos sem e com adição de vanilina nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação. 65

Tabela 5.5 – Resultados para os experimentos sem e com adição de siringaldeído nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação. 67

Tabela 5.6 – Resultados para os experimentos sem e com adição de ácido *p*-hidroxibenzoico nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação.....69

Tabela 5.7 – Resultados para os experimentos sem e com adição de ácido vanílico nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação. 70

Tabela 5.8 – Resultados para os experimentos sem e com adição de ácido siríngico nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação. 71

Tabela 5.9 – Resultados para os experimentos sem e com adição de ácido cumárico nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose

residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação. 73

Tabela 5.10 – Resultados para os experimentos sem e com adição de ácido ferúlico nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação. 74

Tabela 5.11 – Resumo dos resultados para a comparação dos valores dos parâmetros de fermentação relativos a cada controle. Os valores mostrados indicam a variação percentual do valor em comparação com o controle. Todos os cálculos foram realizados para o tempo de 6 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* de panificação 77

Tabela 5.12 – Condições otimizadas para identificação dos compostos modelo por espectrometria de massas. 79

Tabela 5.13 – Valores da massa molar dos compostos modelo, do *m/z* referente ao seu íon $[M-H]^-$ no modo negativo de ionização e seus respectivos tempos de retenção. 79

Tabela 5.14– Resultados da glicose residual em massa e percentual, da concentração de etanol, dos rendimentos dos produtos (massa de células, glicerol, ácido acético e etanol) em relação à glicose consumida e da produtividade volumétrica de etanol. Valores calculados para o tempo de 6 h de fermentação, para o teste inicial sem adição dos compostos modelo. 83

Tabela 5.15 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de *p*-hidroxibenzaldeído. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 8 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2 86

Tabela 5.16 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de vanilina. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados para a fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2, após 6 h para o controle e após 8 h para o teste com de 0,1 $g.L^{-1}$ de vanilina 94

Tabela 5.17 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de siringaldeído. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol e aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 8 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2. 101

Tabela 5.18 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido *p*-hidroxibenzoico. Valores referentes à glicose residual em massa e

percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol e aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 8 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2. 108

Tabela 5.19 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido vanílico. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol e aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 6 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2 para o teste controle e após 8 h para o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido vanílico. 114

Tabela 5.20 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol e aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 6 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2 para o teste controle e após 8 h para o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico. 121

Tabela 5.21 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido cumárico. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol e aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 6 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2. 126

Tabela 5.22 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido ferúlico. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol e aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 6 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2. 132

Tabela 5.23 – Resumo dos resultados. Os valores mostrados indicam a variação percentual do valor em comparação com o controle. Dados para a levedura *S. cerevisiae* PE-2. Todos os compostos foram adicionados na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$. 135

SUMÁRIO

1. Introdução.....21

2. Revisão Bibliográfica.....26

2.1. As usinas de açúcar e de etanol no Brasil.....26

2.2. Fermentação Alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*.....27

2.3. O etanol de segunda geração.....29

2.3.1. Constituição da parede celular e características morfológicas da cana-de-açúcar.....30

2.3.2. Entraves relativos à produção de etanol de segunda geração.....33

2.3.3. Inibidores de processos fermentativos realizados por *Saccharomyces cerevisiae*.....35

3. Objetivos.....44

3.1. Objetivo geral.....44

3.2. Objetivos específicos.....44

4. Materiais e métodos.....45

4.1. Micro-organismos.....45

4.2. Preparação do inóculo.....46

4.3. Meio de fermentação.....47

4.4. Compostos fenólicos utilizados nas fermentações.....47

4.5. Condições de fermentação.....48

4.6. Experimentos sem adição da levedura *S. cerevisiae* PE-2.....49

4.7. Métodos analíticos.....50

4.7.1. Determinação da concentração celular.....50

4.7.2. Determinação da concentração de glicose, glicerol, ácido acético e etanol.....51

4.7.3. Determinação do pH.....52

4.7.4. Determinação da concentração dos compostos fenólicos e dos possíveis produtos de bioconversão.....52

4.8. Determinação dos parâmetros fermentativos 53

4.8.1. Cálculo dos parâmetros fermentativos 54

4.8.2. Cálculo dos desvios-padrão 55

5. Resultados e discussão 57

5.1. Experimentos de fermentação de glicose a etanol utilizando a levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* 58

5.1.1. Perfil fermentativo para a levedura de panificação, sem adição dos compostos fenólicos 58

5.1.2. Testes de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* de panificação, com adição dos compostos modelo 62

5.1.2.1. Avaliação da variação do pH 62

5.1.2.2. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de *p*-hidroxibenzaldeído nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ 63

5.1.2.3. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de vanilina nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ 65

5.1.2.4. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de siringaldeído nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ 66

5.1.2.5. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de ácido *p*-hidroxibenzoico nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ 68

5.1.2.6. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de ácido vanílico nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ 69

5.1.2.7. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de ácido siríngico nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ 71

5.1.2.8. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de ácido cumárico nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ 72

5.1.2.9. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de ácido ferúlico nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ 74

5.1.2.10. Comparação dos resultados para os parâmetros de fermentação dos 8 compostos fenólicos testados 76

5.2. Experimentos de fermentação de glicose a etanol, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 78

5.2.1. Identificação dos compostos fenólicos nos cromatogramas de íons totais pelos seus espectros de massas 78

5.2.2. Avaliação dos ensaios com os compostos fenólicos (individualmente) no meio fermentativo, sem adição da levedura *S. cerevisiae* PE-2 80

5.2.3. Perfil da fermentação pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, sem adição dos compostos modelo 81

5.2.4. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de *p*-hidroxibenzaldeído na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$ 84

5.2.5. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de vanilina na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$ 91

5.2.6. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de siringaldeído na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$ 98

5.2.7. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de ácido *p*-hidroxibenzoico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$ 105

5.2.8. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de ácido vanílico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$ 111

5.2.9. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de ácido siríngico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$ 117

5.2.10. Perfila da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de ácido cumárico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$ 123

5.2.11. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de ácido ferúlico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$ 129

6. Conclusão 136

Referências 139

Apêndices 145

Apêndice A – Curvas de calibração 145

Apêndice B – Cromatogramas de íons totais (TIC) e de íon extraído (XIC) para os compostos modelo, após 6 h nos ensaios realizados sem adição da levedura *S. cerevisiae* PE-2 152

Apêndice C – Espectro de massas dos íons fragmento para os compostos modelo e para os produtos da biotransformação no meio fermentativo 157

1. Introdução

O suprimento mundial de energia primária é fortemente dependente de fontes de origem fóssil. Segundo a *International Energy Agency*, IEA, em seu relatório de 2013 (dados de 2011), a matriz energética mundial é fortemente dependente do petróleo (31,5%), seguida do carvão mineral (28,8%) e do gás natural (21,3%), perfazendo um total de 81,6%. A energia nuclear contribui com 5,1%. O restante, 13,3%, provém de fontes renováveis, que inclui a biomassa, a energia solar, a eólica, a hídrica e outras. (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2013).

Das fontes renováveis de energia, nos interessa, neste trabalho, a denominada bioenergia moderna. Considera-se bioenergia moderna a biomassa que, após secagem e aumento da densidade do combustível sólido, pode ser queimada diretamente, ou a biomassa convertida em combustíveis líquidos ou gasosos, usando as tecnologias de primeira ou de segunda geração, dependendo do seu nível de desenvolvimento. (UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAM, 2007). O etanol é um desses combustíveis líquidos, atualmente obtido no Brasil de forma economicamente viável pela fermentação do caldo de cana (tecnologia de primeira geração). A implantação de formas economicamente viáveis de produção de etanol a partir do bagaço da cana de açúcar (tecnologia de segunda geração) ainda encontra-se em desenvolvimento. Ambas, porém, utilizam micro-organismos, especificamente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

As motivações para a realização de estudos com micro-organismos são de várias ordens. A invenção do microscópio, por volta de 1600, possibilitou a posterior descoberta desses seres. Desde então, inúmeros estudos se desenvolveram em vários campos: na ação dos micro-organismos na decomposição dos alimentos e da biomassa no meio natural; na produção de alimentos, como pães e bebidas; na relação entre alguns micro-organismos e doenças; dentre vários outros campos.

Este trabalho tem como contexto motivador a busca de alternativas energéticas aos combustíveis de origem fóssil, visando à produção de combustíveis a partir da ação de micro-organismos sobre a biomassa vegetal, com ênfase nos resíduos agrícolas.

A preocupação com a forte dependência da matriz energética em relação às fontes fósseis não é recente e vem crescendo, em especial após as crises mundiais de petróleo de 1973 e de 1979, quando o preço dessa *commodity* se elevou drasticamente. Além dos elevados preços, a geopolítica internacional tornou evidente, a partir da criação da Organização dos Países Produtores de Petróleo (OPEP), que as maiores jazidas de petróleo se encontravam em regiões politicamente conturbadas, fato que agravava a possibilidade de escassez no suprimento desse recurso, em particular.

O Brasil pode ser considerado um dos países pioneiros no enfrentamento da dependência da matriz energética em relação às fontes fósseis de energia. Um programa governamental inédito, o ProÁlcool, estimulou a produção de etanol para uso em automóveis, com regulamentação do setor e subsídios. As indústrias de álcool utilizavam o caldo da cana-de-açúcar que, por fermentação, produz o etanol. Nesse programa, o álcool hidratado foi utilizado em substituição à gasolina, e o álcool anidro, como seu aditivo, numa proporção que variou de 20 a 25%. Em ambos os casos, o etanol ajudou a diminuir as importações de gasolina. No caso do aditivo à gasolina, ele funcionou também como antidetonante, em substituição ao chumbotetraetila e ao metiltercbutiléter (MTBE).

O ProÁlcool teve seu ápice em meados da década de 1980, quando então declinou. A produção de álcool carburante, porém, não parou mais. Nessa época, os preços do petróleo se tornaram mais competitivos e o etanol ficou menos atraente, tanto para o consumidor, devido ao preço, quanto para o produtor, devido à alta de preços do açúcar no mercado internacional. Em todo o período do ProÁlcool, o incentivo governamental e a regulação do mercado interno de combustíveis líquidos foram fundamentais para o estabelecimento do setor. De 1976 a 1996, os custos de produção do álcool carburante, por barril equivalente de petróleo (bep) caíram de aproximadamente 90 US$/bep para aproximadamente 45 US$/bep (PROÁLCOOL..., 2010), contribuindo para que o setor se tornasse, então, independente dos subsídios governamentais. A partir de

2003, a tecnologia dos carros *Flex-fuel* ou bicombustíveis, deu novo estímulo à indústria do álcool carburante.

A possibilidade de escassez do petróleo não é o único fator que motivou a comunidade internacional na procura de alternativas para a matriz energética. Os aspectos ambientais se tornaram um valor crescente e a Conferência de Estocolmo, em 1972, pode ser considerada um marco. Outras conferências se sucederam. Em 1992, a Organização das Nações Unidas (ONU) promoveu a Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento, na cidade do Rio de Janeiro/Brasil. Essa conferência ficou conhecida como ECO-92, ou RIO-92, reuniu vários chefes de estado e produziu documentos importantes, dentre eles a Agenda 21, acordo estabelecido entre 179 países para a elaboração de estratégias visando o desenvolvimento sustentável (DECLARATION…, 2014). O Protocolo de Kyoto, de 1997, estabeleceu limites de emissão de gases de efeito estufa (KYOTO..., 2014). Porém, o modelo de produção industrial não se alterou de forma significativa e esses limites não foram alcançados. Em 2002, a ONU promoveu em Johannesburgo, África do Sul, a primeira conferência na qual o tema energia foi o foco central. Intitulada "*World Summit for Sustainable Development*" (WSSD), essa cúpula mundial para o desenvolvimento sustentável gerou, posteriormente, o documento *Sustainable Bioenergy: A Framework for Decision Makers* (Energia Sustentável: Uma Ferramenta para Tomada de Decisão). Nesse documento (UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAM, 2007), dentre outras abordagens, foram sugeridas nove questões básicas para o desenvolvimento sustentável das tecnologias referentes à bioenergia moderna: (1) habilidade da bioenergia moderna em prover serviços de energia para os pobres; (2) implicações para o desenvolvimento agro-industrial e geração de empregos; (3) implicações de saúde e de gênero da bioenergia moderna; (4) implicações para a estrutura da agricultura; (5) implicações para a segurança alimentar; (6) implicações para o orçamento governamental; (7) implicações para o comércio, para a balança comercial e para a segurança em energia; (8) impactos na biodiversidade e no gerenciamento de recursos naturais e; (9) implicações nas mudanças climáticas. Dessa forma, compreende-se que o completo desenvolvimento dessas tecnologias só será alcançado com projetos amplos que vislumbrem os aspectos acima sinalizados pelo documento da ONU.

Em especial, questões relacionadas à segurança alimentar e às implicações nas mudanças climáticas têm gerado maior controvérsia e discussão.

Esforços em relação à melhoria das práticas agrícolas, evitando-se as queimadas, controle das pragas com menor uso de inseticida, desenvolvimento de espécies de cana mais produtivas e mais resistentes, tem tornado o setor mais adequado aos conceitos atuais de sustentabilidade. Um dos fortes argumentos em favor do uso de biocombustíveis para se alcançar um desenvolvimento sustentável se refere ao fato de que, em sua queima, esses combustíveis não contribuem, de forma permanente, para o aumento dos gases de efeito estufa. Isso porque há um ciclo do carbono, que começa com o crescimento do vegetal e absorção do gás carbônico para realizar a fotossíntese, de forma a compensar em parte o gás carbônico emitido em sua queima. Assim, o etanol traria implicações favoráveis sob o enfoque das mudanças climáticas, em especial em relação ao aquecimento global. Ele é um biocombustível líquido avançado, não havendo, atualmente, nenhum outro cuja utilização seja tão viável.

O Brasil vem fomentando a pesquisa em biocombustíveis. Centros como a Embrapa, o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e a empresa Fermentec trabalham há anos gerando conhecimento e tecnologia voltados, dentre outros, para o desenvolvimento do setor sucroalcooleiro. Vários pesquisadores nas universidades, em especial do Estado de São Paulo (ESALQ/USP, EEL/USP, UNICAMP), vem recebendo verbas através do Programa FAPESP de Pesquisa em Bioenergia (Bioen) e do CNPq e da Capes, dentre outras. Somando-se a esses esforços, o governo federal inaugurou, em 22 de janeiro de 2010, as instalações do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), um centro de pesquisa cuja missão é “contribuir para o avanço do conhecimento científico e tecnológico na produção, uso e conversão de biomassas em energia e materiais, por meio de pesquisa, desenvolvimento, inovação e capacitação de pessoal” (MISSÃO..., 2014) .

Assim, a produção de etanol no Brasil encontra-se hoje num patamar avançado, seja em tecnologia largamente implementada no setor agro-industrial, seja em pesquisa e desenvolvimento.

No presente trabalho, procurou-se ampliar os estudos existentes em relação ao aproveitamento da biomassa vegetal, trazendo o foco para a investigação da ação individual dos principais compostos fenólicos, oriundos da

degradação da lignina, sobre o processo fermentativo da glicose a etanol realizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* de panificação e pela cepa PE-2. Essas substâncias fenólicas são formadas a partir da degradação da lignina, quando o bagaço da cana-de-açúcar é submetido à explosão a vapor.

Consideramos que, quando a hidrólise enzimática da celulose do bagaço e da palha de cana se tornar viável, tanto técnica quanto economicamente, a fermentação da glicose liberada ocorrerá em um meio que, provavelmente, conterá os compostos oriundos da degradação da lignina. Isso porque, para que se realize a hidrólise, o bagaço tem que ter sido submetido a um pré-tratamento que retire parte da lignina.

A nossa proposta vislumbra uma primeira hipótese de que, após um pré-tratamento para remoção de parte da lignina, segue-se a hidrólise da celulose. Todo o material (hidrolisado hemicelulósico e celulósico) seria utilizado para a diluição do melaço, no processo de primeira geração, realizando a fermentação conjunta.

Outra hipótese é que, como Nascimento (2007) encontrou compostos aromáticos de baixa massa molar no bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, uma hidrólise ácida desse bagaço pré-tratado, para obtenção do açúcar fermentescível, a glicose, irá liberar maior quantidade desses compostos, pois a lignina sofrerá decomposição nesse tipo de hidrólise. Assim, a fermentação irá ocorrer na presença dos compostos de baixa massa molar formados nesse processo.

Esperamos que os resultados deste trabalho possam ser úteis para avaliar a viabilidade de um processamento conjunto do material pós-hidrólise (enzimática ou ácida) como diluente do melaço. Além disso, nossos resultados poderão auxiliar em escolhas futuras das melhores condições de fermentação na presença desses compostos fenólicos ou mesmo na escolha seletiva de processos de destoxificação.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. As usinas de açúcar e de etanol no Brasil

Segundo dados publicados pela Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB, em seu terceiro levantamento de safra 2013/2014, a área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2013/14 está estimada em 8,82 x 10^6 ha. A previsão da safra 2013/2014 é de 659,85 x 10^6 t de cana-de-açúcar para ser moída, com aumento de 12,0% em relação à safra 2012/13, que foi de 588,92 x 10^6 t. A produtividade obtida na safra 2013/14 representou um crescimento de 7,9% na média geral, passando de 69,407 t x ha^{-1} para 74,891 t x ha^{-1}. Para a produção de etanol, serão destinadas 355,61 x 10^6 t de cana-de-açúcar. Essa produção fechou em 23,64 x 10^9 L na safra 2012/13 e é estimada em 27,66 x 10^9 L para safra atual de 2013/14, um incremento de 16,98%. Desse total, 11,73 x 10^9 L deverão ser de etanol anidro e 15,93 x 10^9 L de etanol hidratado. (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

As usinas de álcool e açúcar, no Brasil, em sua maioria (85%) utilizando o sistema de batelada alimentada, produzem etanol combustível a partir da fermentação do caldo de cana ou do melaço diluído com água, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As dornas de fermentação variam de 0,5 a 3 x 10^6 L, nas quais a levedura ocupa cerca de 10 a 15% do volume do vinho. Para a produção de álcool combustível, as usinas brasileiras apresentam uma característica única, ao utilizar um “grande volume de células de leveduras que são reaproveitadas em sucessivos reciclos durante a safra da cana-de-açúcar”. (AMORIM; LOPES, 2013). Até a década de 1980, praticamente todas as usinas utilizavam a levedura de panificação para dar partida ao processo industrial de produção de etanol combustível. Não havia, nessa época, um processo confiável de seleção das leveduras, sendo muito difícil diferenciar uma cepa de outra. Com o desenvolvimento da técnica de cariotipagem, que diferencia as leveduras pelo tamanho de seus cromossomos, as leveduras puderam ser identificadas e diferenciadas (AMORIM et al., 2004). Isso tornou possível acompanhar qual cepa

da levedura *S. cerevisiae* permanecia até o final do processo de fermentação. Basso et al., 1994; 2008, relataram que, ao longo das sucessivas bateladas, nas quais as leveduras são reaproveitadas, a permanência do levedo de pão não ultrapassava 30 dias dos cerca de 200 dias da safra. Ocorre que uma série de leveduras mais resistentes desenvolvem-se no meio fermentativo, pois são mais adaptadas às condições estressantes do processo industrial. Assim, em trabalhos desenvolvidos em conjunto pela ESALQ e pela empresa Fermentec, associadas ao *Institut Supérieur des Products de la Vigne et du Vin*, cepas da levedura *S. cerevisiae* começaram a ser selecionadas dentre as que apresentavam maior permanência e dominância no meio fermentativo industrial (AMORIM; LOPES, 2013). Essas cepas também reúnem características desejáveis como alto rendimento na produção de etanol, elevada resistência à contaminação por bactérias, pouca formação de espuma e boa velocidade de fermentação. “Estas leveduras, PE2, CAT1 e FT858L, selecionadas pela Fermentec e as linhagens BG1 e SA1 selecionadas pela Copersucar (atualmente CTC) têm sido introduzidas em diversas destilarias brasileiras a cada safra” (AMORIM; LOPES, 2013). Segundo esses autores, atualmente, 170 destilarias em todo país (41% das unidades industriais) fazem uso dessas leveduras.

Neste trabalho, tanto a levedura *S. cerevisiae* de panificação quanto a linhagem PE-2 foram objetos de estudo, cujos resultados serão relatados no Capítulo 5.

2.2. Fermentação Alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo aeróbio facultativo e, portanto, ajusta-se metabolicamente em ambientes de aerobiose e de anaerobiose. Os produtos finais em cada situação metabólica vão variar. Em aerobiose, a levedura transforma a maior parte das hexoses em biomassa, CO_2 e H_2O. Na ausência de um aceptor de elétrons, no caso o oxigênio molecular, a maior parte dos açúcares é convertida em etanol e CO_2, processo conhecido como fermentação alcoólica. Os carboidratos considerados para a fermentação tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como glicogênio e

trealose) como exógenos (sacarose, glicose e frutose), esses últimos fornecidos à levedura. (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

O objetivo primordial da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, é gerar uma forma de energia, ATP (adenosina trifosfato) que será empregada na realização dos diversos trabalhos biológicos (absorção, excreção e outros) e biossínteses, necessários à manutenção da vida, crescimento e multiplicação, para perpetuar a espécie. O etanol e o CO_2 resultantes não têm utilidade metabólica para a célula em anaerobiose, sendo apenas produtos de excreção. Porém, em condições de aerobiose, o etanol e outros produtos de excreção, como glicerol e ácidos orgânicos, podem ser oxidados pela levedura para gerar ATP e biomassa. (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Durante a fermentação, são formados alguns produtos secundários. Polissacarídeos, lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos, etc, necessários à formação de biomassa e de outros produtos de interesse metabólico, relacionados direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência. Assim, juntamente com etanol e CO_2, cerca de 5% dos açúcares são convertidos para gerar tais produtos secundários. Pasteur, com condições ótimas de fermentação, confirmou esse dado e, portanto, o rendimento máximo de etanol por unidade de massa de açúcar é de 95%. Industrialmente esse rendimento gira em torno de 90%. (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Concentrações elevadas de açúcares aumentam a velocidade de fermentação, a produtividade e, dentro de certos limites, diminuem o crescimento do fermento e a formação de glicerol. Entretanto, elevados teores de açúcar acarretam um estresse osmótico da levedura e, dependendo do processo fermentativo, há um nível considerado ideal. Nas destilarias brasileiras, as concentrações dos mostos, comumente expressas em graus Brix, variam entre 15 e 25° Brix, com médias entre 18 a 20° Brix (de 180 a 200 $g.L^{-1}$ de sólidos). A concentração do inóculo está entre 10 e 20 g de leveduras por litro de mosto. (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

A *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais eficiente para a produção de etanol. Ela, porém, não é capaz de fermentar pentoses, como a xilose. Essa característica seria altamente desejável para o desenvolvimento das técnicas de produção do etanol de segunda geração. O desenvolvimento de técnicas de engenharia genética visa combinar características fermentadoras de xilose, por

exemplo, de *Pichia Stipitis,* com a alta eficiência fermentativa da *Saccharomyces cerevisiae*, introduzindo nessa última um caminho metabólico de xilose natural na primeira. Vários estudos foram realizados utilizando esse tipo de organismo recombinante para a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos (MARTÍN et al., 2002; Nichols et al., 2008).

2.3. O etanol de segunda geração

Uma das perspectivas vislumbradas pelo documento da ONU para o desenvolvimento sustentável de bioenergia moderna se refere à produção de etanol a partir da biomassa, em especial dos materiais lignocelulósicos (UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAM, 2007).

No caso do Brasil, a biomassa da cana-de-açúcar, na forma do bagaço de cana, encontra algumas vantagens para ser utilizada na produção de etanol. O bagaço de cana tornou-se um material lignocelulósico de grande interesse, pois ele já se encontra dentro da unidade industrial que produz etanol combustível a partir do caldo da cana-de-açúcar. Ao contrário de outros resíduos, como palha de milho e resíduos florestais, o bagaço de cana não gera custos adicionais de coleta e transporte. Outro resíduo da cana-de-açúcar é a palha. Seu aproveitamento é de fundamental importância para o balanço econômico que considera o aproveitamento integral da biomassa da cana. Além disso, o aproveitamento da palha evitaria os custos ambientais resultantes das queimadas realizadas para removê-la do campo.

A fermentação alcoólica dos materiais lignocelulósicos, porém, ainda encontra barreiras tecnológicas significativas. Ela ainda não é uma tecnologia comercial e industrialmente viável, ao contrário da fermentação do caldo de cana. De modo geral, as barreiras tecnológicas se relacionam à recalcitrância dos materiais lignocelulósicos aos tratamentos que visam obter monossacarídeos fermentescíveis a partir da sua biomassa. A análise da estrutura da parede celular nos ajuda a compreender a dificuldade de obtenção dos açúcares simples.

2.3.1. Constituição da parede celular e características morfológicas da cana-de-açúcar

A parede celular dos materiais lignocelulósicos é formada por celulose, hemiceluloses e lignina. Esses componentes variam, qualitativa e quantitativamente, de acordo com o tipo de planta (FENGEL; WEGENER, 1989). Porém, para a produção de etanol, interessam apenas os polissacarídeos, que são a celulose e as hemiceluloses. A lignina, assim, precisa ser removida para que se tenha acesso aos carboidratos. Na parede celular, porém, esses três grupos se encontram intimamente relacionados e qualquer processo de separação utilizado incorre em perdas de componentes. O desafio dos pré-tratamentos é remover a lignina com a máxima recuperação da celulose e das hemiceluloses (SILVA, 2005).

A celulose é a base estrutural das células das plantas, sendo a substância natural mais importante e mais abundante produzida pelos organismos vivos. Ela é formada por unidades de anidroglucopiranose, formando um polímero linear com cadeia uniforme. Essas unidades são unidas por ligações glicosídicas do tipo β-(1 ⟶ 4), ou seja, duas moléculas adjacentes de glicose são unidas por seus grupos hidroxila dos carbonos 1 e 4. A posição β da hidroxila exige uma rotação de 180° na unidade vizinha, ao longo do eixo C1-C4 do anel piranosídico. Essas duas unidades de anidroglucopiranose formam a unidade de repetição da celulose, que é a celobiose, cujo comprimento é de 1,03 nm. Em uma das extremidades da cadeia da celulose há um grupo OH ligado ao carbono 1 (C1-OH), o qual é um terminal redutor (derivado do hemiacetal), enquanto na outra extremidade há uma hidroxila alcoólica ligada ao carbono 4 (C4-OH), o qual não apresenta características redutoras (FENGEL; WEGENER, 1989). Uma representação da molécula da celulose é mostrada na Figura 2.1.

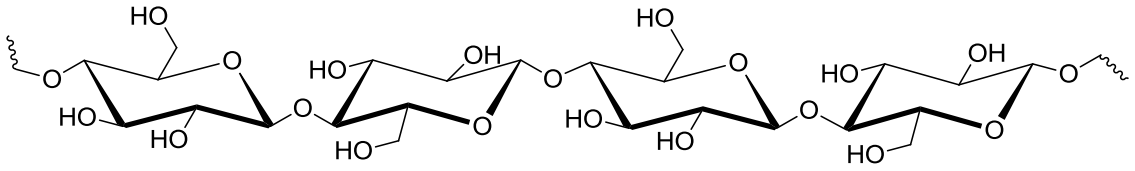


Figura 2.1 – Fórmula estereoquímica da celulose. (FENGEL; WEGENER, 1989)

As hemiceluloses diferem da celulose por apresentarem em sua composição diferentes tipos de açúcares, por terem uma cadeia carbônica mais curta e ramificações. As unidades que compõem as hemiceluloses incluem as pentoses, as hexoses, os ácidos hexurônicos e as desoxi-hexoses. A classificação mais comum para as hemiceluloses é feita segundo seus principais componentes, sendo então que, por esse critério, as hemiceluloses são chamadas de xilanas, mananas, galactanas, etc. (FENGEL; WEGENER, 1989).

Com relação às hemiceluloses, as gimnospermas (madeiras moles) e as angiospermas (madeiras duras) diferem não só em porcentagem, mas também em composição. Além da glicose, as madeiras moles apresentam quantidades apreciáveis de manose e de galactose enquanto que nas madeiras duras, há o predomínio de xilose e maior quantidade de grupos acetil do que as madeiras moles. A Figura 2.2 ilustra uma representação de xilana com grupos acetil.

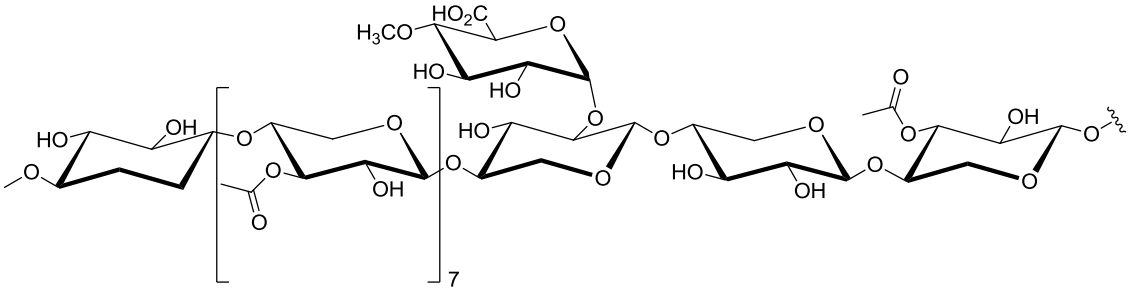
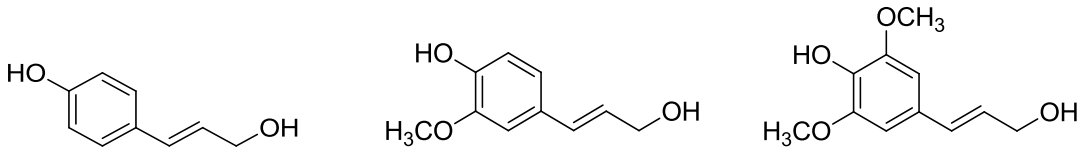


Figura 2.2– Representação de uma xilana. (FENGEL; WEGENER, 1989)

Diferentemente da celulose e das hemiceluloses, que são polissacarídeos, a lignina constitui-se em uma macromolécula aromática. É a principal macromolécula orgânica aromática do planeta, responsável pelas propriedades mecânicas das plantas superiores - gimnospermas e angiospermas (FENGEL; WEGENER, 1989). Ocorre em tecidos vasculares especializados em transporte de líquidos e suporte. Nas fases finais do crescimento celular das plantas superiores, ocorre o processo de lignificação da célula. A lignina se forma entre as novas células e no interior da parede celular. Cedo e rapidamente, ocorre a lignificação tanto da área entre as células (lamela média) quanto da parede primária. A lignificação da parede secundária é um processo mais gradual. A lignina se forma a partir de três precursores, que são unidades de fenilpropano: os alcoóis *p*-cumarílico (H), coniferílico (G) e sinapílico (S), representados na Figura 2.3. Os tipos de lignina são classificados em relação à proporção em que

esses precursores entram na composição da lignina. (FENGEL; WEGENER, 1989).



Álcool *p*-cumarílico Álcool coniferílico Álcool sinapílico

Figura 2.3 – Representação das unidades fenilpropano precursoras da lignina.

Essas unidades se unem por ligações estáveis do tipo C-C, aril-éter e aril-aril. Um modelo proposto para a lignina é mostrado na figura 2.4.

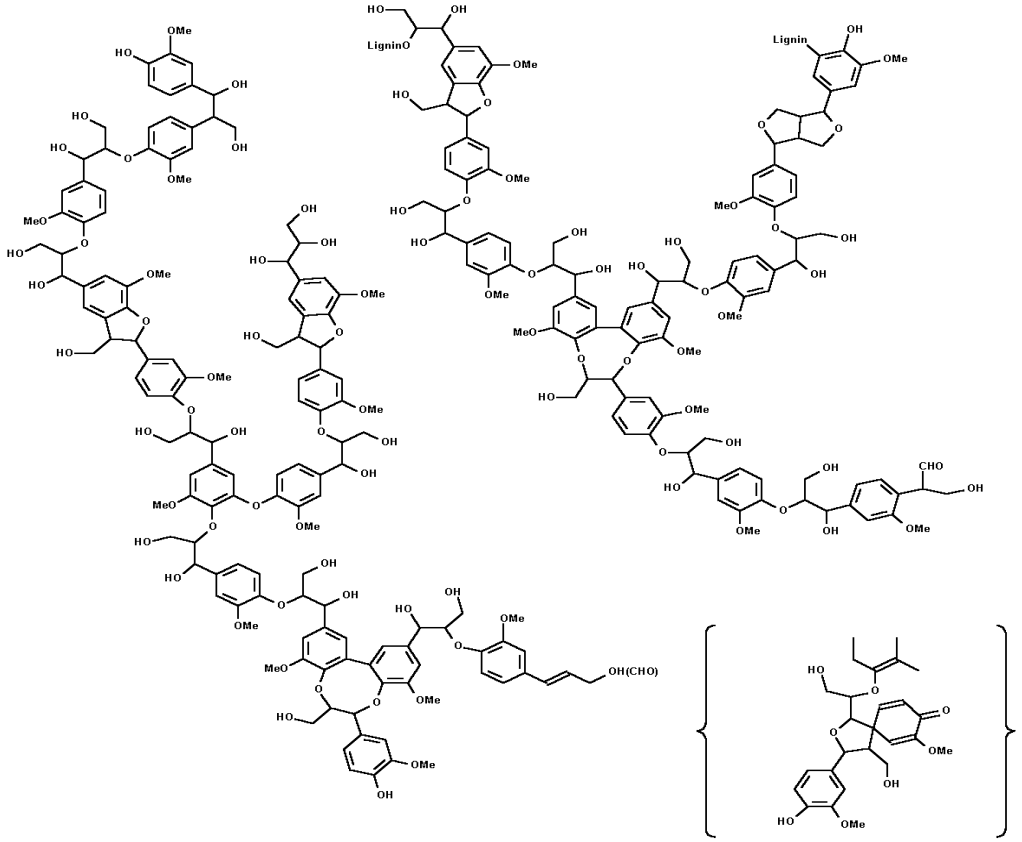


Figura 2.4 – Modelo de uma estrutura para a lignina. (http://www4.ncsu.edu/~dsargyro/)

Segundo Dahlgren *et al.*. (1985), a cana-de-açúcar (gênero *Saccharum*) pertence à família das gramíneas (Poaceae ou Gramineae), classe das monocotiledôneas (Monocotyledonae), divisão das angiospermas (Magnoliophytae ou Angiospermae).

Essa planta não produz madeira em seu sentido estrito, mas seu caule é fisicamente resistente (BUTTERFIELD, 1980). Como a cana-de-açúcar é uma angiosperma, a hemicelulose mais abundante no bagaço de cana é a xilana. A lignina presente é do tipo HGS.

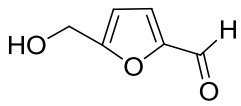
2.3.2. Entraves relativos à produção de etanol de segunda geração

Pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos são necessários para viabilizar o acesso à celulose e às hemiceluloses presentes na parede celular. Dentre esses pré-tratamentos, a explosão a vapor tem sido um dos métodos mais eficientes (SILVA, 1995). Seguindo-se à explosão a vapor, os polissacarídeos precisam ser transformados em monossacarídeos por hidrólise (preferencialmente catalisada por ácidos ou enzimas) e então, com os monossacarídeos disponíveis, procede-se à fermentação alcoólica. O desenvolvimento dos processos de hidrólise se constitui em ponto fundamental para o desenvolvimento do etanol a partir do bagaço e da palha de cana (biomassa), ou seja, do etanol de segunda geração.

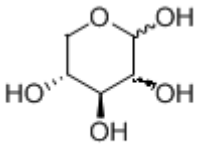
Durante os pré-tratamentos, são formados compostos de degradação dos açúcares e da lignina. Esses compostos podem atuar como inibidores tanto do crescimento dos micro-organismos quanto da fermentação alcoólica. O tipo e a quantidade desses compostos variam principalmente em função da matéria-prima e do tipo de pré-tratamento utilizado (HAHN HÄGERDAL; OLSSON, 1996). O estudo do efeito da concentração desses compostos em processos fermentativos é, portanto, de grande interesse para o desenvolvimento de tecnologias viáveis para a produção de etanol.

No bagaço de cana, foram identificados potenciais inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico do bagaço pré-tratado por explosão a vapor (CUNHA, 2005), formados a partir da degradação de açúcares e da lignina. Cunha (2005) estudou a influência desses compostos, presentes no hidrolisado hemicelulósico, na fermentação de xilose (meio sintético), pelos micro-organismos *Pichia stipitis* e *Candida shehatae*, avaliando o crescimento microbiano e a produção de etanol. Nascimento (2007) identificou esses compostos no bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. O pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar, por explosão a vapor, foi realizado (CUNHA, 2005) nas seguintes condições: temperatura de 190°C, por 15 min. Nessas condições, foram solubilizados 32,7 ± 0,3% do bagaço de cana. A composição química do bagaço pré-tratado apresentou 57,5 ± 0,1% de glucana, 9,9 ± 0,5% de xilana, 0,70 ± 0,04% de grupos

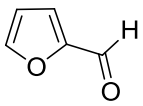
acetil, 27,9 ± 0,3% de lignina total (0,6 ± 0,2% de lignina solúvel e 27,3 ± 0,1% de lignina insolúvel) e 2,7 ± 0,8% de cinzas, com um balanço de massas de 99 ± 3%. A composição do hidrolisado apresentou 1,27% de oligômeros de glucose, 0,052% de hidroximetilfurfural [1], 2,64% de xilose [2], 12,1% de oligômeros de xilose, 0,67% de furfural [3], 0,573% de arabinose [4], 0,26% de arabinose ligada a oligômeros de xilose, 1,02% de ácido acético [5], 0,75% de grupos acetil e 4,49% de compostos detectados como lignina solúvel. a quantidade de compostos não identificados no hidrolisado foi de 9,2%. Os compostos presentes no hidrolisado foram separados por extração líquido-líquido com diferentes solventes, obtendo-se 3 frações aquosas e 6 frações orgânicas.



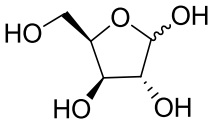
[1]



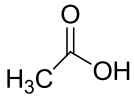
[2]



[3]



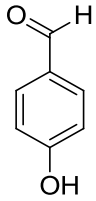
[4]



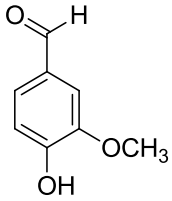
[5]

No tocante ao presente trabalho, nos interessam os compostos fenólicos que foram identificados e quantificados em 2 frações orgânicas, oriundos da degradação da lignina. Os compostos e sua concentração, em $g.L^{-1}$, são: *p*-hidroxibenzaldeído [6] (0,008), vanilina [7] (0,002), siringaldeído [8] (0,002), ácido *p*-hidroxibenzoico [9] (0,0013), ácido vanílico [10] (0,006), ácido siríngico [11] (0,0005), ácido trans-cumárico [12] (0,07) e ácido ferúlico [13] (0,004).

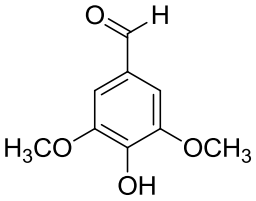
Nascimento (2007), ao contrário do esperado, identificou os mesmos compostos de baixa massa molar no bagaço pré-tratado por explosão a vapor. Esses compostos, porém, não foram quantificados.



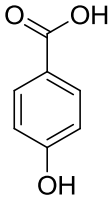
[6]



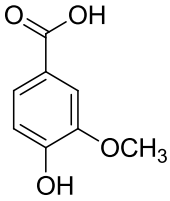
[7]



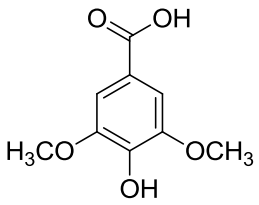
[8]



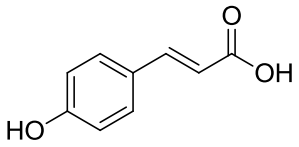
[9]



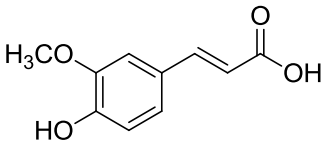
[10]



[11]



[12]



[13]

O presente trabalho tem como foco o estudo da ação desses 8 compostos fenólicos de baixa massa molar, em processos fermentativos utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* de panificação adquiridas no comércio varejista comum e a cepa *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, isolada dos meios fermentativos em usinas brasileiras (Basso et al., 2008) e gentilmente cedida pelo prof. Luiz Carlos Basso, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo - ESALQ/USP.

2.3.3. Inibidores de processos fermentativos realizados por *Saccharomyces cerevisiae*

Hahn Hägerdal e Olsson (1996) citaram vários trabalhos sobre inibição da fermentação de glicose a etanol, utilizando o micro-organismo *S. cerevisiae* e utilizaram as cinco categorias para descrever as substâncias inibidoras de fermentação:

1) Compostos liberados durante o pré-tratamento, como o ácido acético;

2) produtos gerados pela degradação de açúcares, como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF);

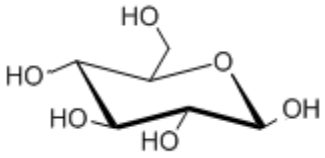
3) produtos de degradação da lignina (compostos aromáticos de baixa massa molar);

4) produtos da fermentação, como o etanol, acetaldeído, ácidos fórmico e lático;

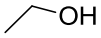
5) íons metálicos remanescentes, por exemplo, provenientes da corrosão de equipamentos, como ferro, cromo e, no caso da biomassa em estudo, íons metálicos também podem ser originários dos extrativos do bagaço.

Dessas 5 categorias, as 3 primeiras foram alvo desta revisão bibliográfica.

Pampulha e Loureiro (1989), usando uma cepa mutante (deficiência respiratória) de *S. cerevisiae*, calcularam a taxa de fermentação através do monitoramento da taxa de produção de CO_2, em meio sintético contendo glicose [14] (20 $g.L^{-1}$), minerais e vitaminas. Eles estudaram o efeito inibitório do ácido acético [5] e do etanol [15], além do efeito sinérgico dos mesmos. Os autores relataram que o ácido acético a 1,3 $g.L^{-1}$ (em pH 3,5) e a 4,7 $g.L^{-1}$ (em pH 5,5), inibiu a fermentação alcoólica em 50% e que o etanol produziu efeito sinérgico. O etanol foi adicionado ao meio de fermentação, em duas concentrações diferentes (5 e 10%), apresentando o mesmo tipo de efeito, em três valores de pH testados (3,5, 4,5 e 5,5). O efeito de inibição foi maior em pH baixos, levando à conclusão de que o ácido acético a membrana plasmática. Pampulha e Loureiro-Dias (1989) confirmaram esse resultado, acrescentando que o ácido acético, ao penetrar a membrana da célula, se ioniza no meio intracelular, devido ao pH mais elevado desse meio, diminuindo o pH intracelular.[1]



[14]



[15]

Boyer et al. (1992) investigaram a extensão da inibição, por furfural [3], do crescimento de *S. cerevisiae* ATCC 24860, do consumo de glicose [14] e da produção de etanol [15] em batelada. O crescimento celular foi realizado comparando-se diferentes concentrações iniciais do inóculo (0,1 a 9,0 $g.L^{-1}$), na presença de concentrações crescentes de furfural (0 a 2,0 $g.L^{-1}$), em meio sintético contendo glicose (100 $g.L^{-1}$) e 3% de extrato de levedura. O aumento da concentração de furfural estendeu a fase *lag* e diminuiu a concentração máxima de células, mas isso não ocorreu quando a concentração do inóculo era alta. Para uma concentração de inóculo de 0,1 $g.L^{-1}$ e concentração de furfural de 2,0 $g.L^{-1}$, a fase lag foi de 12 h. Com essa mesma concentração de furfural e concentração

---

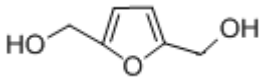
[1] O pk_a do ácido acético é igual a 4,74. Assim, em pH = 3,5, tem-se que a [HAc] = 17 x [Ac^-]. Logo, é preferencialmente o ácido acético que penetra a membrana celular. Em pH = 5,5, tem-se que a [HAc] = 0,17 x [Ac^-]. Portanto, concluiu-se que o ácido acético penetrou a membrana celular e se ionizou no meio intracelular, diminuindo seu pH. Daí sua maior toxicidade em valores mais baixos de pH do meio.

de inóculo de 9,0 $g.L^{-1}$, a fase lag diminuiu. O aumento da concentração de furfural provocou a diminuição da concentração máxima de células ao final da fermentação. Esses resultados podem indicar um prejuízo no crescimento celular ou a destruição de células pelo furfural. Assim, o furfural afetou tanto a velocidade de crescimento quanto a concentração máxima de células. O consumo de glicose foi pouco afetado pela presença do furfural, diminuindo levemente. Esse efeito tornou-se menos significativo ainda com o aumento da concentração do inóculo. Quanto à produção de etanol, os autores relataram que houve uma diminuição na velocidade inicial, mas a quantidade máxima do álcool não foi afetada. O fator de conversão total, calculado a partir da glicose, foi de 0,493 $g.g^{-1}$, independente da concentração do inóculo ou da concentração de furfural. Esse valor representou 96% do rendimento teórico. Boyer et al. (1992), ainda, analisaram a depleção de furfural no meio de fermentação. Com o aumento da concentração do inóculo, o tempo de depleção do furfural passou de 15-21 h (0,1 $g.L^{-1}$ de inóculo) para 5-6 h (2,0 $g.L^{-1}$ de inóculo). Com altas concentrações de inóculo, praticamente todo o furfural foi eliminado em três horas de fermentação. Entretanto, nesse trabalho, nada foi discutido em relação aos metabólitos formados a partir do furfural.

Outro inibidor importante nos hidrolisados lignocelulósicos é o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) [1], que é formado como resultado da desidratação térmica de hexoses (ULBRICHT; NORTHUP; THOMAS, 1984). Os primeiros estudos sobre os efeitos do 5-HMF sobre a *S. cerevisiae* foram realizados no contexto da produção de etanol. Efeitos sobre a taxa de crescimento e de fermentação foram reportados nas concentrações de 0,5 a 2,0 $g.L^{-1}$, utilizando *C. guilliermondii* 1241 e *S. cerevisiae* 87 (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988). O 5-HMF revelou ser menos tóxico às leveduras do que o furfural [3]. No caso da *S. cerevisiae* isso também ocorre, apesar desse composto levar mais tempo para ser convertido do que o furfural. Sanchez e Bautista (1988) propuseram que o efeito do 5-HMF sobre o processo fermentativo da *S. cerevisiae* seria apenas o prolongamento da fase *lag*.

Taherzadeh et al. (2000) estudaram os efeitos fisiológicos causados na *S. cerevisiae* CBS 8066, por 5-HMF [1], na ausência e na presença de furfural [3]. A fermentação foi realizada em culturas em batelada, meio sintético de glicose (50 $g.L^{-1}$) com adição pulsada de 5-HMF (2 a 4 $g.L^{-1}$) e de 5-HMF juntamente com furfural (2 $g.L^{-1}$). A adição de 4 $g.L^{-1}$ de 5-HMF causou um decréscimo (~32%) na

taxa de formação de CO_2. A cepa utilizada foi capaz de converter o 5-HMF em álcool 5-hidroximetilfurfurílico [16], como principal produto, um composto menos tóxico às leveduras.



[16]

Quando o 5-HMF foi adicionado juntamente com o furfural, pouca conversão do 5-HMF foi observada até que o furfural fosse completamente consumido. Além disso, a taxa de conversão de ambos foi mais baixa do que quando adicionados separadamente e, enquanto ambos estavam presentes no meio de fermentação, o crescimento celular foi completamente inibido. Nesse estudo, um composto não reportado anteriormente foi encontrado como um produto da conversão de 5-HMF pela *S. cerevisiae*, provavelmente em uma reação com o piruvato, catalisada pela piruvato descarboxilase. Esse composto foi caracterizado por espectrometria de massa. Entretanto não é relatado qual seria esse composto.

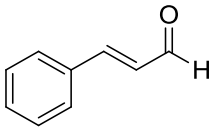
Ando et al. (1986) relataram a inibição da fermentação alcoólica, em meio sintético, por *Saccharomyces cerevisiae*, devido a produtos provenientes da degradação da lignina de madeira de álamo pré-tratada por explosão a vapor a 205°C, por 10 minutos. Nesse estudo, os autores estimaram o grau de inibição dos compostos aromáticos em função de seus grupos funcionais, a partir dos resultados da fermentação: CH=CH = +3,0, CHO = +1,5, *p*-OH = +1,0, COOH = +0,5, *m*-OH = 0 e OCH_3 = -1,0. Os valores calculados do grau de inibição dos compostos correlacionaram-se bem com os resultados da fermentação. Eles sugerem o uso desses valores para (a) selecionar solventes efetivos para a lavagem de inibidores; (b) transformar esses inibidores em compostos inativos por métodos químicos e biológicos; (c) melhorar as condições da explosão a vapor para minimizar a formação de inibidores e (d) para selecionar leveduras que resistem a esses inibidores.

Nos testes de fermentação, o pH foi ajustado entre 5,5-6,0 e utilizou-se o seguinte meio ($g.L^{-1}$): glicose (150), peptona (10), extrato de levedura (5) (PGTY) e os compostos aromáticos a 0,1% (1,0 $g.L^{-1}$). O meio foi autoclavado e os compostos adicionados ao meio através de um filtro estéril, 0,45 µm. Antes da fermentação, a levedura *S. cerevisiae* Hakken n.1 foi pré-incubada em meio PGY

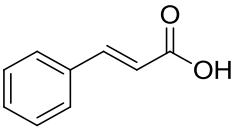
por um dia, a 30°C, lavada com água esterilizada e inoculada em 200 mL do meio de fermentação. A concentração inicial foi ajustada para 1 x 10^6 células.mL^{-1}. A fermentação foi conduzida em erlenmeyers de 300 mL e acompanhada por 220 h, sem agitação. A massa de CO_2 formada foi medida e convertida em fator de conversão de substrato em etanol.

A inibição foi relatada, dentre outras medidas, pelo rendimento percentual na produção de etanol em relação ao controle (53%), após 50h de fermentação[2]. A fase lag do controle foi de 18 h.

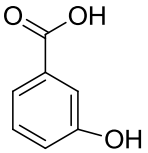
Cinamaldeído [17] e ácido cinâmico [18], com grau de inibição de +4,5 e +3,5, respectivamente, inibiram totalmente a produção de etanol (0%). Os compostos *p*-hidroxibenzaldeído [6] (+2,5), ácido *p*-hidroxibenzoico [9] (+1,5) e vanilina [7] (+1,5) obtiveram 15%, 37% e 40% de rendimento, sendo considerados inibidores moderados. Siringaldeído [8] (+0,5), ácido *m*-hidroxibenzoico [19] (+0,5), ácido vanílico [10] (+0,5) e ácido siríngico [11] (-0,5) atingiram um fator de conversão de glicose em etanol de 45%, 48%, 52% e 62%, não tendo sido considerados inibidores nas concentrações testadas, em função do erro experimental (ANDO et al, 1986).



17



18



19

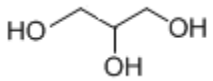
Os autores atribuíram os valores numéricos ao poder inibidor de cada substância. Porém, não fica claro, no artigo, exatamente relativo a que, um valor 0,5, por exemplo, foi atribuído a um grupo funcional? Eles argumentam que esses valores empíricos estão diretamente correlacionados com a inibição de foi observada nos experimentos com os compostos modelo.

Larsson et al. (2000) investigaram a influência de hidroxi-metoxi-benzaldeídos, difenois/quinonas e de derivados fenilpropanos no crescimento e na produção de etanol por *S. cerevisiae* de panificação, em ensaios utilizando um meio sintético, com 20 g.L^{-1} de glicose [14], agitação de 150 rpm, a 30°C por 24h,

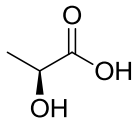
---

[2] Os autores não discutem porque o rendimento da produção de etanol no controle teve um valor tão baixo. Talvez a inibição observada seja problemática e algumas substâncias essenciais ao metabolismo da levedura tenham faltado no meio de fermentação.

em condições de limitação de oxigênio. A concentração inicial de inóculo foi ajustada para densidade ótica (DO) igual a 0,5 (medida a 620 nm), que correspondeu a 0,16 $g.L^{-1}$. O crescimento celular foi determinado durante a fermentação pela medição da DO da cultura a cada hora, por 12h e ao final da fermentação (24h). Amostras para análise em CLAE foram retiradas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 12 e 24 h. Foram determinadas as concentrações de glicose, etanol [15], glicerol [20], ácido acético [5] e ácido lático [21]. Além desses (e sob outras condições da análise por CLAE), foram analisados os compostos aromáticos utilizados e identificados alguns dos produtos de degradação.

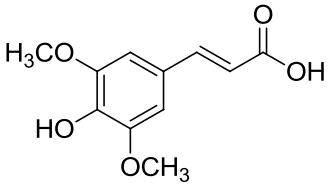


[20]



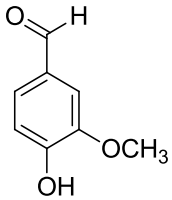
[21]

Para os testes de inibição, Larsson et al. (2000) utilizaram 20 compostos aromáticos, dentre os quais alguns identificados em hidrolisados hemicelulósicos, outros de ocorrência natural e um terceiro grupo foi escolhido devido à presença de grupos específicos substituintes do anel aromático, apenas para efeito de comparação do efeito desses substituintes. Os compostos foram adicionados ao meio de fermentação nas concentrações de 0,02, 0,2 e 1,0 $g.L^{-1}$, e para os poucos solúveis, não se utilizou a maior concentração. Um experimento de referência acompanhou cada grupo de experimentos, sendo os valores de referência, uma média dos mesmos. O fator de conversão de glicose em etanol na fermentação de referência foi de 0,405 ± 0,008 $g.g^{-1}$ (79,3%), a produtividade volumétrica de etanol, para o tempo de 8 h de fermentação foi de 0,67 ± 0,09 $g.L^{-1}.h^{-1}$, a taxa de crescimento de microbiano foi de 0,110 ± 0,004 $g.L^{-1}.h^{-1}$ e o rendimento de biomassa foi de 0,076 ± 0,004 $g.g^{-1}$ de glicose consumida. Os autores compararam esses parâmetros em fermentações com adição individual dos compostos aromáticos, nas concentrações citadas. Nas concentrações testadas, a inibição do crescimento foi observada para todos os compostos examinados, exceto para o ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinâmico [22].

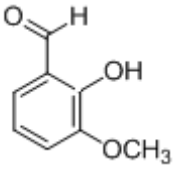


[22]

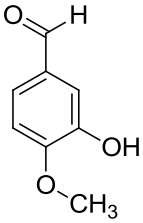
O crescimento celular foi geralmente mais influenciado do que o fator de conversão de glicose em etanol, para todos os compostos que apresentaram efeito inibitório. A inibição dos hidroxi-metoxi-benzaldeídos (vanilina [7], *o*-vanilina [23] e isovanilina [24]) foi altamente dependente da posição dos grupos substituintes, mais do que da identidade do grupo. Por exemplo, o grupo hidroxila na posição *orto* mostrou-se mais inibitório do que na posição *para*. Assim, a *o*-vanilina foi muito mais inibitória do que a vanilina e a isovanilina. Porém, não houve diferença significativa de inibição entre a vanilina e a isovanilina. Como produtos de degradação desses compostos pela levedura, foram encontrados seus alcoóis correspondentes.



[5]

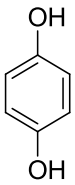


[23]

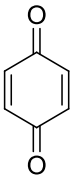


[24]

Comparando-se as formas oxidadas e reduzidas como, por exemplo, o par hidroquinona [25] e *p*-benzoquinona [26] (esse par foi o que apresentou a maior diferença entre seus efeitos inibitórios), Larsson et al. (2000) concluíram que a forma oxidada é a de maior poder inibitório, tendo a *p*-benzoquinona inibido completamente tanto o crescimento microbiano quanto a produção de etanol.



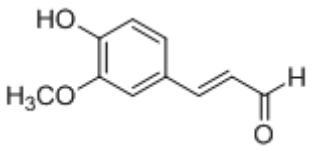
[25]



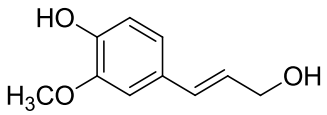
[26]

Por fim, outro grupo de substâncias, os derivados fenilpropano, foi investigado com respeito à diferença de toxicidade dependente do estado oxidado ou reduzido do carbono γ, da presença e da posição da insaturação na cadeia alifática lateral e do número e da identidade do substituinte: hidroxil ou metoxil.

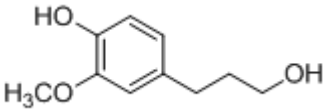
Comparando-se os aldeídos com seus alcoóis correspondentes, esses se mostraram menos inibitórios. A presença ou ausência da dupla ligação na cadeia lateral mostrou grande diferença de efeito inibitório, sendo que os compostos com dupla ligação se mostraram mais inibitórios. A posição desta ligação na cadeia lateral, porém, não exerceu diferença na capacidade de inibição dos compostos. As transformações ocorridas nos compostos aromáticos durante a fermentação incluem a redução de aldeídos e de quinonas e a saturação das duplas ligações. Alcoóis aromáticos foram detectados como produtos da redução dos respectivos aldeídos, conforme relatado para as vanilinas, tendo ocorrido o mesmo com aldeído coniferílico [27], sendo os compostos álcool coniferílico [28] (produto de redução) e álcool dihidroconiferílico [29] (produto de redução e saturação da dupla ligação) identificados como os principais produtos de sua transformação.



[27]



[28]



[29]

Compostos de alta massa molar foram detectados como produtos da transformação da *p*-benzoquinona. A hidroquinona foi detectada como seu produto de redução (LARSSON et al., 2000).

Estudos da inibição por substâncias presentes em hidrolisados também foram realizados utilizando-se organismos geneticamente modificados. Martín et al. (2002) investigaram o comportamento de uma espécie recombinante de *Saccharomyces cerevisiae,* capaz de fermentar xilose [2], frente a um hidrolisado de bagaço de cana, obtido por explosão a vapor, seguido de tratamento enzimático com enzimas celulolíticas. Nesse caso, porém, o hidrolisado recebeu tratamentos de destoxificação. Um dos tratamentos foi uma destoxificação química por “overliming”. Nesse processo, adiciona-se hidróxido de cálcio, 20% em massa, ao hidrolisado hemicelulósico até pH 10. Após uma hora a pH 10, o hidrolisado é filtrado. Ao filtrado adiciona-se ácido sulfúrico até pH 5,5, sendo então realizada uma nova filtração. O fator de conversão de substrato em etanol na fermentação da cepa recombinante do hidrolisado destoxificado por

“overliming” foi de 0,18 g etanol.g^{-1} bagaço seco, enquanto que no hidrolisado não-destoxificado, foi de 0,13 g etanol.g^{-1} bagaço seco, representando 35% e 25% do valor teórico, respectivamente.

O estudo dos inibidores dos processos fermentativos é bastante complexo, sendo dependente, dentre outros fatores, do tipo de hidrolisado, do micro-organismo fermentador e das condições de fermentação, tais como a concentração dos açúcares e do inóculo, como pode ser percebido a partir dos trabalhos discutidos.

Há alguns estudos que mostram o avanço das pesquisas com *S. cerevisiae* e a ação dos inibidores dos processos de crescimento celular e de fermentação alcoólica. Porém, como vimos, poucos estudos utilizaram a cana-de-açúcar como matéria-prima. Além disso, as concentrações de açúcar e de biomassa estudados têm valores bem inferiores aos encontrados no processo industrial brasileiro de obtenção do etanol combustível.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

- Contribuir para o desenvolvimento da produção de etanol de segunda geração a partir da fração celulósica do bagaço de cana de açúcar pré-tratado por explosão a vapor.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito dos compostos fenólicos, oriundos da degradação da lignina, na produção de etanol pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (panificação) e *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, em meio semidefinido;
- avaliar a bioconversão desses compostos pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2;
- identificar os produtos de bioconversão dos compostos fenólicos em meio semidefinido fermentado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2.

4. Materiais e métodos

4.1. Micro-organismos

Na primeira parte do trabalho, utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, comprada no comércio local da cidade de Lorena / SP, como levedura de panificação comercial (fermento biológico), da marca Fleischmann. O fermento de panificação não foi manipulado em ambiente estéril.

Na segunda parte, utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, cepa isolada das usinas de etanol do Brasil (BASSO et al., 2008) e gentilmente cedida pelo prof. Luis Carlos Basso, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP.

Antes de realizar as fermentações com a nova levedura, foi necessário realizar o procedimento de repique. A cultura pura foi repicada em meio de cultura sólido YEPD (extrato de levedura 5 $g.L^{-1}$; peptona 10 $g.L^{-1}$; glicose anidra 20 $g.L^{-1}$ e ágar 20 $g.L^{-1}$) distribuído em tubos de ensaio devidamente vedados com rolha de algodão, envoltos em papel alumínio e autoclavados (0,5 atm, 10 minutos). Ao sair da autoclave, os tubos de ensaio foram inclinados para obter maior área de contato do meio YEPD. Depois de resfriados, os tubos foram inoculados na câmara de fluxo laminar com o auxílio de uma alça estéril e permaneceram em estufa a 30ºC de 24 a 48 h para permitir o crescimento da cultura e, posteriormente, foram armazenados em geladeira. Dessa forma, a levedura mantém-se inativa por até 6 meses, caso o meio sólido não perca umidade. A cada 6 meses esse procedimento foi repetido. A levedura *S. cerevisiae* PE-2 foi manipulada em condições de assepsia.

Na segunda fase dos trabalhos, todo o procedimento envolvendo a levedura *S. cerevisiae* PE-2 foi realizado em condições de assepsia. Todos as vidrarias utilizadas foram autoclavados por 10 minutos à pressão de 1,0 atm e os meios utilizados foram autoclavados por 10 minutos à pressão de 0,5 atm. Para não ocorrer contaminação das leveduras, o manuseio da biomassa foi realizado em câmara de fluxo laminar previamente limpa com uma solução alcoólica a 70% e esterilizada por uma lâmpada de luz ultravioleta, por 15 minutos. Esses

procedimentos foram realizados em todas as transferências: a inoculação inicial para propagação em meio sólido, a transferência para o meio líquido para propagação em meio líquido, transferências para os tubos de centrífuga para separação da levedura do meio de crescimento, transferências dos tubos de centrífuga para o balão volumétrico, constituindo o inóculo e, por último, a inoculação no meio de fermentação.

4.2. Preparação do inóculo

A partir dos repiques em meio sólido, o crescimento da levedura da cepa PE-2 foi realizado em meio líquido, visando aumento de biomassa e posterior fermentação. A cultura foi reativada em meio YEPD, sem Agar (5 mL, 30°C, 24 a 48 h), transferida totalmente, de forma asséptica, para 100 mL do mesmo meio e incubada nas mesmas condições. Depois, todo o material foi transferido para 1,5 L de meio contendo sacarose 100 g.L^{-1}; extrato de levedura 2,5 g.L^{-1}; ureia 0,6 g.L^{-1}; K_2HPO_4 0,87 g.L^{-1}; $MgSO_4.7H_2O$ 0,49 g.L^{-1}; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,029 g.L^{-1}; $MnSO_4.H_2O$ 0,017 g.L^{-1}), incubados a 30°C durante 48 h, em um erlenmeyer de 4 L. Após 48 h, o adicionou-se novamente 1,5 L deste meio. Esse procedimento de troca foi feito até obter-se biomassa suficiente para o ensaio.

Para decantar a levedura no meio de cultura, deixou-se o erlenmeyer de 4 L por uma noite na geladeira, para facilitar a retirada do sobrenadante, que foi descartado cuidadosamente. As células foram lavadas com uma solução tampão de fosfato de potássio pH 7,04 (K_2HPO_4 0,1 mol.L^{-1} e KH_2PO_4 0,1 mol.L^{-1}, na proporção de 6:4). O restante do tampão foi adicionado ao meio contendo a levedura e transferido para tubos de centrífuga de 50 mL. A biomassa foi centrifugada a 3000 rpm, 10°C, 20 min, utilizando a centrífuga da marca JOUAN, modelo CR4i e ressuspendida com a solução tampão 3 vezes e, ao final, a suspensão obtida foi avolumada em um balão de 500 mL, do qual foram retiradas alíquotas para determinação da quantidade de massa de células por espectrofotometria.

4.3. Meio de fermentação

Os ensaios de fermentação com a levedura de panificação foram realizados em um meio semidefinido contendo inicialmente 20 $g.L^{-1}$ de células (biomassa) e 180 $g.L^{-1}$ de glicose. A solução com os nutrientes foi escolhida a partir de trabalhos anteriores (TAHERZADEHR et al., 1996; MODIG et al., 2008), com adaptações. Assim, a composição do meio de fermentação utilizado foi ($mg.L^{-1}$): KH_2PO_4 (3500), $MgSO_4$. $7H_2O$ (75), $CaCl_2$.$2H_2O$ (9), $(NH_4)_2SO_4$ (7500), $ZnSO_4$.$7H_2O$ (9), $FeSO_4$. $7H_2O$ (6), H_3BO_3 (2), $MnCl_2$.$2H_2O$ (0,8), Na_2MoO_4.$2H_2O$ (0,8), $CoCl_2$.$2H_2O$ (0,6), $CuSO_4$.$5H_2O$ (0,6), KI (0,2), EDTA (30); extrato de levedura (0,5%) e octanol como antiespumante (1mL. L^{-1} – aprox. 20 gotas. L^{-1}).

Para a levedura *S. cerevisiae* PE-2, as fermentações foram realizadas em meio semidefinido contendo 20 $g.L^{-1}$ de células (biomassa), 160 $g.L^{-1}$;de glicose anidra, com os nutrientes: extrato de levedura 2,5 $g.L^{-1}$; ureia 0,6 $g.L^{-1}$; K_2HPO_4 0,87 $g.L^{-1}$; $MgSO_4$.$7H_2O$ 0,49 $g.L^{-1}$; $ZnSO_4$.$7H_2O$ 0,029 $g.L^{-1}$; $MnSO_4$.H_2O 0,017 $g.L^{-1}$., conforme BASSO et al. (2008).

4.4. Compostos fenólicos utilizados nas fermentações

Os compostos investigados neste trabalho foram anteriormente identificados em trabalhos do nosso grupo de pesquisa e são oriundos da degradação da lignina. Cunha (1999; 2005) identificou esses compostos no hidrolisado hemicelulósico e Nascimento (2007) identificou-os no bagaço de cana. Essas frações, hidrolisado hemicelulósico e bagaço de cana, foram obtidas a partir do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, por explosão a vapor, em condições otimizadas.

As fermentações foram realizadas com adições individuais dos seguintes compostos fenólicos (Sigma Aldrich): *p*-hidroxibenzaldeído [6], vanilina [7], siringaldeído [8], ácido *p*-hidroxibenzoico [9], ácido vanílico [10], ácido siríngico [11], ácido cumárico [12] e ácido ferúlico [13], cujas fórmulas estruturais estão identificadas conforme o número citado, nas páginas 34 e 35.

Nas fermentações com a levedura *S. cerevisiae* de panificação, esses compostos foram adicionados nas concentrações de 0,6 e de 1,0 $g.L^{-1}$. Já nas fermentações com a levedura *S. cerevisiae* PE-2, esses compostos foram adicionados na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$.

4.5. Condições de fermentação

Para a levedura de panificação, inicialmente foi realizado um estudo para conhecer o perfil da fermentação alcoólica pela levedura de panificação (consumo de glicose, produção de etanol, de massa celular, de glicerol e de ácido acético) sem adição dos compostos modelo. O experimento foi conduzido em triplicata, em frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL do meio de cultura, tampados com rolha de algodão envolta em gaze. Utilizaram-se três erlenmeyers para cada tempo de amostragem. Os frascos foram colocados em um agitador orbital, com agitação de 100 rpm, a 30°C, por 9 h. As amostras foram retiradas no tempo inicial e nos tempos de 2, 4, 6, 8 e 9 h. Duas alíquotas de 10 mL foram retiradas de cada erlenmeyer, transferidas para tubos de centrífuga (imersos em banho de gelo), centrifugadas a 3000 rpm, por 7 minutos. O sobrenadante foi separado e novamente centrifugado para retirada total da massa celular. Por fim, separou-se o novo sobrenadante, que foi adicionado ao primeiro. Esse líquido foi guardado a –18°C para posterior análise de glicose, glicerol, ácido acétido e etanol por cromatografia líquida. A massa de células da levedura que ficou no tubo foi ressuspensa com água destilada, agitada no vórtex e, após nova centrifugação, dispensou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se novamente a levedura, que foi guardada sob refrigeração (4°C) para posterior avaliação da massa de células. O meio que restou no erlenmeyer (cerca de 30 mL) teve seu valor de pH determinado e foi descartado.

Os experimentos com adição individual dos compostos fenólicos foram realizados nas mesmas condições, sempre acompanhados de um teste controle (sem adição do composto fenólico). A adição dos compostos ocorreu nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ e foram coletadas amostras para análises apenas no tempo inicial e após 6 h de fermentação.

Para cada grupo de ensaios de fermentação, preparou-se o meio de fermentação (com e sem adição do composto fenólico), ajustou-se o pH entre 4,5 e 5,0, utilizando-se uma solução de ácido sulfúrico 6,0 mol.L^{-1}, inoculou-se a levedura e completou-se o volume para 1,0 L. Após esse procedimento, uma alíquota de 50 mL foi transferida para cada erlenmeyer de 125 mL (em triplicata). Dessa forma, como será mostrado no Capítulo 5, o valor do pH inicial foi o mesmo para as três amostras do tempo inicial de cada teste.

Para a levedura S. *cerevisiae* PE-2, o procedimento experimental foi similar ao relatado para a levedura de panificação. Porém, no caso da levedura *S. cerevisiae* PE-2, a manipulação da levedura foi realizada em ambiente estéril e o pH inicial ajustado entre 5,5 e 6,0. Os ensaios foram realizados em triplicata (três erlenmeyers para cada tempo de amostragem), em frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL do meio de cultura, tampados com rolha de algodão envolta em gaze, em agitador orbital (100 rpm, 30ºC). As amostras foram retiradas nos tempos 0, 2, 4, 6, 7 e 8 h. A adição dos compostos ocorreu na concentração de 0,1 g.L^{-1}.

4.6. Experimentos sem adição da levedura *S. cerevisiae* PE-2

Para controle de uma possível interação dos componentes do meio de fermentação com os compostos fenólicos, foram realizados experimentos sem inoculação da levedura *S. cerevisiae* PE-2, utilizando-se o mesmo meio semidefinido contendo 180 g.L^{-1} de glicose anidra; extrato de levedura 2,5 g.L^{-1}; ureia 0,6 g.L^{-1}; K_2HPO_4 0,87 g.L^{-1}; $MgSO_4.7H_2O$ 0,49 g.L^{-1}; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,029 g.L^{-1}; $MnSO_4.H_2O$ 0,017 g.L^{-1}. Preparou-se 2 L do meio e ajustou-se o pH entre 5,5 e 6,0. Esse meio foi transferido para 8 balões volumétricos de 200 mL, contendo separadamente massa suficiente de cada um dos compostos fenólicos para atingir a concentração de 0,1 g.L^{-1}. Após aferição dos balões utilizando-se o meio semidefinido, esses foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL, tampados com papel alumínio e autoclavados (0,5 atm, 10 min).

Em ambiente asséptico, coletaram-se as amostras do tempo inicial em triplicata para cada sistema. O volume de 50 mL foi transferido para erlenmeyers de 125 mL, em triplicata, para os meios com cada um dos compostos modelo.

Esses erlenmeyers foram tampados com rolha de algodão envolto em gaze (previamente autoclavados).

Os ensaios foram realizados em triplicata, em agitador orbital (100 rpm, 30ºC) por 6 h, retirando-se amostras de 10 mL de cada erlenmeyer no tempo final. Para esses ensaios, foram realizadas análises das amostras dos tempos 0 e 6 h para identificação e quantificação dos compostos fenólicos utilizados e possíveis produtos de degradação.

4.7. Métodos analíticos

4.7.1. Determinação da concentração celular

O primeiro método de determinação do crescimento microbiano consistiu na leitura da absorbância de uma suspensão de células, a 600 nm (densidade ótica), em um espectrofotômetro HALO DB-20 UV-VIS, feixe duplo, da marca Dynamica. Essa leitura foi correlacionada à concentração da suspensão utilizando-se curvas de calibração. A curva de calibração relaciona a absorbância, a 600 nm, à concentração ($g.L^{-1}$) em base seca, da suspensão de células. Todas as curvas realizadas são mostradas no Apêndice A.

Para a determinação dessas curvas de calibração, realizou-se o seguinte procedimento: 3 pesa-filtros foram colocados em estufa a 105°C / 24 h; após 24 h, foram transferidos para um dessecador, onde permaneceram por cerca de 1 h para resfriarem. (O dessecador foi mantido fechado sob vácuo). Pesaram-se os pesa-filtros em balança analítica com precisão de 0,0001 g e anotaram-se as massas, levando-os novamente ao dessecador. Preparou-se uma suspensão de levedura, adicionando-se cerca de 3 g da mesma a um balão volumétrico de 50 mL, que foi avolumado com água destilada; 3 amostras de 10 mL foram colocadas nos pesa-filtros, que foram mantidos em estufa, a 60°C, por 24 h e, em seguida, a 105°C por 3 h. Retiraram-se os pesa-filtros com a massa de levedura, deixando-os resfriarem no dessecador por cerca de 1 h. Determinaram-se as massas em balança analítica. Repetiu-se esse procedimento estufa/dessecador/balança até obter-se massa constante. A partir dos valores das

massas obtidas, determinou-se o peso seco de levedura na suspensão-mãe, calculando-se sua concentração em base seca. Paralelamente a esse procedimento, a suspensão-mãe foi diluída, calculando-se posteriormente as concentrações com base na determinação do seu peso-seco. As absorbâncias, na frequência de 600 nm, foram determinadas para as suspensões diluídas, construindo-se uma curva de calibração. Esse procedimento foi realizado para cada lote de levedura comprado e as curvas de calibração são apresentadas no Apêndice A. Essas curvas serviram de referência para acompanhar o crescimento microbiano durante os experimentos de fermentação. Esse método foi utilizado para as duas cepas.

Para a levedura de panificação, foi realizada a determinação do peso-seco para todas as amostras, além da leitura da densidade ótica. Determinaram-se os pesos-secos das amostras em triplicata retiradas nos tempos 0 h e 6 h. Nos casos em que foi realizada a cinética de crescimento da levedura, o peso-seco foi determinado para todas as amostras coletadas.

4.7.2. Determinação da concentração de glicose, glicerol, ácido acético e etanol

Glicose, glicerol, ácido acético e etanol foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras foram previamente diluídas em água destilada. As amostras dos tempos 0 a 4 h foram diluídas na razão de 1:50 e as amostras dos tempos 6 a 9 h foram diluídas na razão de 1:25. Depois, as soluções diluídas foram filtradas com filtro 0,45 µm (Sartorius) e extraídas em cartuchos de extração sólida Sep-Pak C18 (Waters) para retirada dos compostos fenólicos. Uma amostra de 20 µL foi injetada no cromatógrafo líquido (Waters 600,TSP Spectra System, Waters, Milford, MA, USA), equipado com uma coluna Biorad Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) e com um detector de índice de refração (Waters 2414). A temperatura da coluna foi mantida em 45°C e a do detector em 35°C. As amostras foram eluídas com fluxo de 0,6 mL.min^{-1}, utilizando-se uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,005 mol.L^{-1} como fase móvel, preparada com água deionizada e filtrada, sendo desgaseificada antes da utilização, por um equipamento de

ultrassom marca Microsonic modelo SX-50. As curvas de calibração são apresentadas no Apêndice A.

Para as análises das fermentações realizadas com a levedura *S. cerevisiae* PE-2, utilizou-se outro cromatógrafo, cujo uso foi gentilmente concedido pelo Prof. Dr. André Ferraz, do Laboratório de Química da Madeira da Escola de Engenharia de Lorena – EEL-USP. Esse cromatógrafo, apesar de ser da mesma marca (Waters), era do modelo 1515, com injeção manual das amostras.

4.7.3. Determinação do pH

O pH foi medido utilizando-se o aparelho da marca Tecnal, modelo TEC-3MP, previamente calibrado com soluções-padrão de pH = 4 e pH = 7, da mesma marca. Antes e entre cada medida, o eletrodo foi lavado com água destilada e secado com papel macio. O pH inicial foi medido antes de se distribuir 50 mL do meio de fermentação nos erlenmeyers de 125 mL. Por este motivo, o tempo inicial tem apenas uma medida de pH. Para as amostras do tempo de 6 h de fermentação, a medida do pH ocorreu em triplicata.

4.7.4. Determinação da concentração dos compostos fenólicos e dos possíveis produtos de bioconversão

As análises para identificação e quantificação dos compostos modelo utilizados e para a identificação dos seus prováveis produtos de biotransformação, foram realizadas no equipamento cujo uso foi gentilmente concedido, com acompanhamento técnico especializado, pela Prof. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni, do Instituto de Química da Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, no campus da cidade de Araraquara / SP.

As análises foram realizadas utilizando-se os seguintes equipamentos e condições.

As amostras foram preparadas com diluição de 1:10. Uma alíquota de 1,0 mL foi diluída em água deionizada em um balão de 10 mL.

As amostras dos padrões foram preparadas conforme consta no Apêndice A, no qual também estão as curvas de calibração obtidas.

Para a separação dos compostos, utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência, com o cromatógrafo da marca *Agilent 1200 Series*, equipado com um amostrador automático *Autosampler 1200 Series*, detector *DAD 1260*, bomba quaternária 1200 e forno para coluna 1200. A coluna cromatográfica utilizada foi da marca Kinetex C18 Phenomenex (150 x 4.6 mm) com diâmetro de poro de 5 µm. As amostras foram eluídas com a mistura Água com 0,1% de Ácido Fórmico e Acetonitrila na proporção de 89:11 (v/v). A análise foi realizada no modo isocrático de eluição, com tempo de análise em média 20 min. O volume de injeção foi de 10 µL, com fluxo de 0,8 $mL.min^{-1}$.

As substâncias fenólicas avaliadas neste trabalho foram identificadas e quantificadas por espectrometria de massas. O espectrômetro de massas utilizado foi o 3200 QTRAP (quadrupólo – íon *trap* linear), da marca AB SCiex. A ionização por *eletrospray* (*Turbo Ion Spray*) foi realizada nos modos negativo e positivo. Os parâmetros da fonte de ionização no modo negativo foram: *Ion Spray*: -4500 V, *Curtain Gas*:15 psi, Temperatura: 550°C, *Gas* 1: 45psi, *Gas* 2: 45psi, *Interface heater*: ON. Modo de varredura de íons: *m/z* 50 – 300. Os parâmetros da fonte de ionização no modo positivo foram: *Ion Spray*: 5500 V, *Curtain Gas*:15 psi, Temperatura: 550°C, *Gas* 1: 45psi, *Gas* 2: 45psi, *Interface heater*: ON. Modo de varredura de íons: *m/z* 50 – 300.

Foi realizada a otimização das condições de operação para cada composto, sendo os resultados dessa otimização apresentados no item 5.2.2.

4.8. Determinação dos parâmetros fermentativos

Os resultados das fermentações de glicose a etanol utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae* foram avaliados quanto consumo de glicose e glicose residual (g), fator de conversão de glicose em etanol, $Y_{et/S}$ ($g.g^{-1}$ glicose), concentração de etanol ($g.L^{-1}$), produtividade volumétrica de etanol, Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$), desvio de glicose para glicerol, $Y_{glicerol/S}$ ($g.g^{-1}$ glicose), desvio de glicose para ácido acético, $Y_{ác.acético/S}$ ($g.g^{-1}$ glicose), crescimento microbiano ($g.L^{-1}$), fator de conversão de glicose em células, $Y_{x/s}$ ($g.g^{-1}$ glicose).

4.8.1. Cálculo dos parâmetros fermentativos

- Para o fator de conversão de glicose a etanol, $Y_{et/S,}$ (g etanol . g^{-1} glicose consumida), utilizou-se a equação 4.1.

$$Y_{et/s} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \qquad (4.1)$$

Onde:

P_i = concentração inicial de etanol;
P_f = concentração final de etanol;
S_i = concentração inicial de glicose;
S_f = concentração final de glicose.

- Para o cálculo do fator de conversão de glicose em células, $Y_{x/s}$, ($g.g^{-1}$ glicose consumida), utilizou-se a equação 4.2.

$$Y_{x/s} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{S_f - S_i} \qquad (4.2)$$

Onde:
X_i = concentração inicial de biomassa;
X_f = concentração final de biomassa;
S_i = concentração inicial de glicose;
S_f = concentração final de glicose.

- Para o cálculo da eficiência de conversão de glicose em etanol, ou rendimento percentual de etanol, $Y_{et}(\%)$, utilizou-se a equação 4.3.

$$Y_{et}(\%) = \frac{Y_{et/S\ \text{calculado}}}{Y_{et/S\ \text{teórico}}} x100\% \qquad (4.3)$$

Onde:

$Y_{et}(\%)$ = eficiência de conversão de glicose em etanol, expressa a razão entre fator de conversão de glicose em etanol calculado experimentalmente e o fator de conversão teórico;

$Y_{et/S\ \text{calculado}}$ = fator de conversão de glicose em etanol calculado experimentalmente;

$Y_{et/S\ \text{teórico}} = \frac{2\text{mol}x46\ g.\text{mol}^{-1}_{\text{etanol}}}{1\text{mol}x180\ g.\text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}} = 0{,}511$, valor teórico para a fermentação de glicose a etanol.

- Para o cálculo da produtividade volumétrica de etanol, Q_P ($g.L^{-1}.h^{-1}$), utilizou-se a equação 4.4:

$$Q_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad (4.4)$$

Onde:
Q_P = produtividade volumétrica de etanol;
P_i = concentração inicial de etanol;
P_f = concentração máxima de etanol;
t_i = tempo inicial da fermentação, ou seja, $t_i = 0$;
t_f = tempo no qual a concentração de etanol é máxima.

- Para o cálculo dos desvios de glicose para os subprodutos glicerol e ácido acético, $Y_{P/S}$, ($g.g^{-1}$ glicose consumida), utilizou-se a equação 4.5:

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \quad (4.5)$$

Quando o subproduto *P é o glicerol*, calcula-se $Y_{glicerol/S}$, sendo:
P_i = concentração inicial de glicerol;
P_f = concentração final de glicerol;
S_i = concentração inicial de glicose;
S_f = concentração final de glicose.

Quando o subproduto *P é o ácido acético*, calcula-se $Y_{ác.\,acético/S}$, sendo:
P_i = concentração inicial de ácido acético;
P_f = concentração final de ácido acético;
S_i = concentração inicial de glicose;
S_f = concentração final de glicose.

4.8.2. Cálculo dos desvios-padrão

O rendimento dos produtos formados é calculado a partir de valores médios com seu desvio padrão. Assim, para o cálculo do desvio padrão dos rendimentos, faz-se necessário considerar a propagação de erro (Baccan et al., 2001). Esse cálculo foi realizado para todos os rendimentos calculados.

Sejam:

R = Rendimento do produto de fermentação ou da biomassa;
ΔP = variação da concentração final e inicial deste produto;
P_i = concentração inicial do produto;
P_f = concentração final do produto;
ΔS = variação da concentração final e inicial de glicose;
$s_{\Delta P}$ = desvio padrão de ΔP;
$s_{\Delta S}$ = desvio padrão de ΔS e;
s_R = desvio padrão do rendimento R.

O desvio de ΔP , $s_{\Delta P}$ é calculado pela equação 4.6:

$$s_{\Delta P} = \pm\sqrt{s^2(concentração\ final\ produto) + s^2(concentração\ inicial\ produto)} \quad (4.6)$$

O desvio de ΔS , $s_{\Delta S}$ é calculado pela equação 4.7:

$$s_{\Delta S} = \pm\sqrt{s^2(concentração\ final\ glicose) + s^2(concentração\ inicial\ glicose)} \quad (4.7)$$

O desvio em relação ao rendimento, s_R é calculado pela equação 4.8:

$$s_R = \pm\left(\sqrt{\left(\frac{s_{\Delta P}}{\Delta P}\right)^2 + \left(\frac{s_{\Delta S}}{\Delta S}\right)^2}\right) * R \quad (4.8)$$

5. Resultados e discussão

Na primeira parte deste capítulo, são apresentados os resultados relativos aos experimentos com a levedura de panificação *S. cerevisiae* (item 5.1),

Encontramos na literatura trabalhos que descrevem a ação de diversos compostos que inibem o processo fermentativo por *S. cerevisiae*. Nos trabalhos citados na revisão, as concentrações de açúcares variaram de 20 – 100 $g.L^{-1}$ e as de inóculo de 0,16 - 9,0 $g.L^{-1}$. Nossa intenção foi utilizar concentrações de açúcares e de inóculo próximas às utilizadas pelas usinas de açúcar e álcool no Brasil, que correspondem a valores maiores do que os utilizados naqueles trabalhos.

Assim, os testes com a levedura *S. cerevisiae* de panificação foram realizados com concentrações de glicose em torno de 180 $g.L^{-1}$ e de inóculo de 20 $g.L^{-1}$ (base seca).

Paralelamente ao controle, adicionaram-se individualmente, ao meio de cultura, os compostos fenólicos derivados da lignina (Sigma Aldrich), encontrados no hidrolisado hemicelulósico e no bagaço de cana: *p*-hidroxibenzaldeído [6], vanilina [7], siringaldeído [8], ácido *p*-hidroxibenzoico [9], ácido vanílico [10], ácido siríngico [11], ácido cumárico [12] e ácido ferúlico [13], cujas fórmulas estruturais estão identificadas conforme o número citado, nas páginas 34 e 35. Esses compostos foram inseridos no meio fermentativo, nas concentrações de 0,6 e de 1,0 $g.L^{-1}$.

Na segunda parte deste capítulo, apresentamos os resultados relativos aos experimentos com a levedura *S. cerevisiae* PE-2 (item 5.2). Diferentemente dos anteriores, esses experimentos foram realizados em ambiente estéril, com concentrações de glicose em torno de 160 $g.L^{-1}$ e de inóculo de 20 $g.L^{-1}$ (base seca). Os mesmos compostos fenólicos foram inseridos no meio fermentativo, na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$. Avaliou-se a variação da concentração desses compostos fenólicos no meio fermentativo, identificando-se alguns dos produtos de bioconversão desses compostos pela levedura *S. cerevisiae* PE-2.

Em seguida, os resultados são discutidos um em relação ao outro e em relação aos estudos já relatados na literatura.

5.1. Experimentos de fermentação de glicose a etanol utilizando a levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*

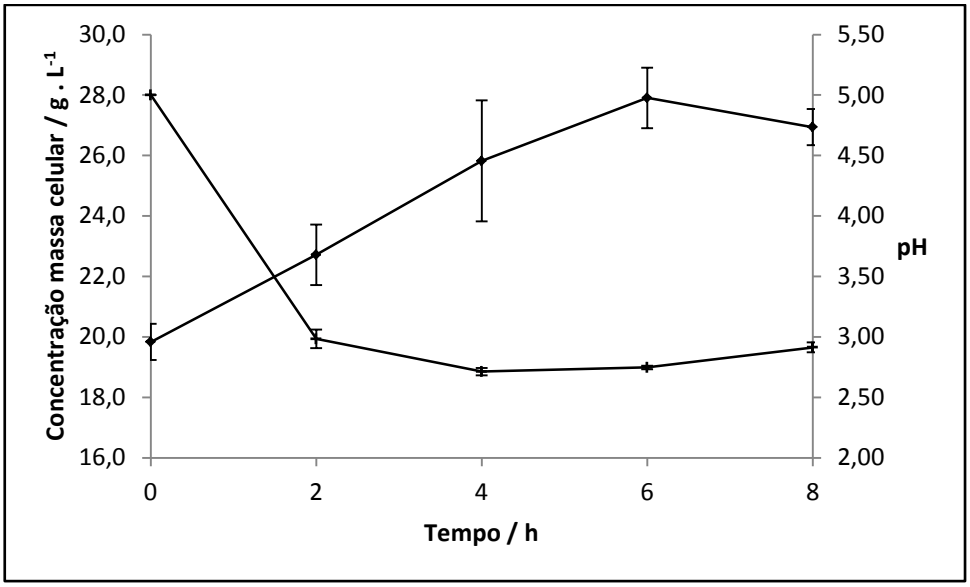
5.1.1. Perfil fermentativo para a levedura de panificação, sem adição dos compostos fenólicos

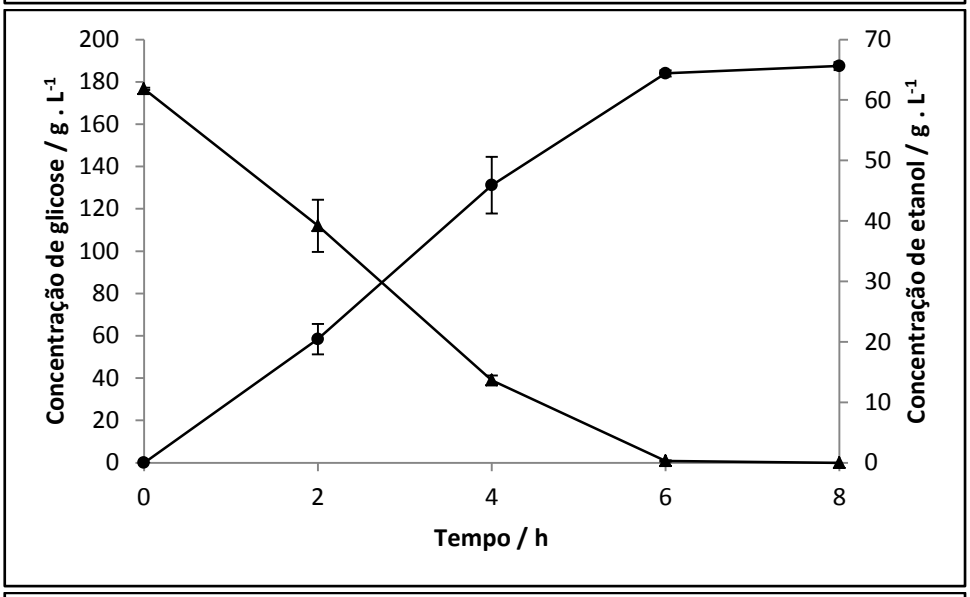
Os resultados para o perfil fermentativo de glicose a etanol pela levedura *S. cerevisiae* de panificação, sem adição dos compostos fenólicos, são mostrados na Figura 5.1.

O pH decresceu rapidamente, passando de 5,0 para 2,98 ± 0,08 em 2 h e para 2,71 ± 0,03 em 4 h, mantendo-se praticamente constante de 4 a 6 h após o início da fermentação. A partir de 6 h, como mostrado na Figura 5.1 (b), a quantidade de glicose era muito pequena. Assim, após o consumo da glicose, o pH se elevou um pouco. Após a acentuada queda nas duas primeiras horas de fermentação, pode-se afirmar que o pH praticamente se manteve constante até o final do processo.

A diminuição do pH era esperada e pode ser explicada devido ao uso do sulfato de amônio, $(NH_4)_2SO_4$, como uma das fontes de nitrogênio. No meio de fermentação, o íon amônio reage com a água, formando amônia e o íon hidrônio, como representado na Equação 5.1. O consumo da amônia durante a fermentação desloca o equilíbrio para formação dos produtos, tornando o meio mais ácido.

$$NH^+_{4(aq)} + H_2O \underset{\leftarrow}{\rightarrow} NH_{3(aq)} + H_3O^+{}_{(aq)} \qquad (5.1)$$





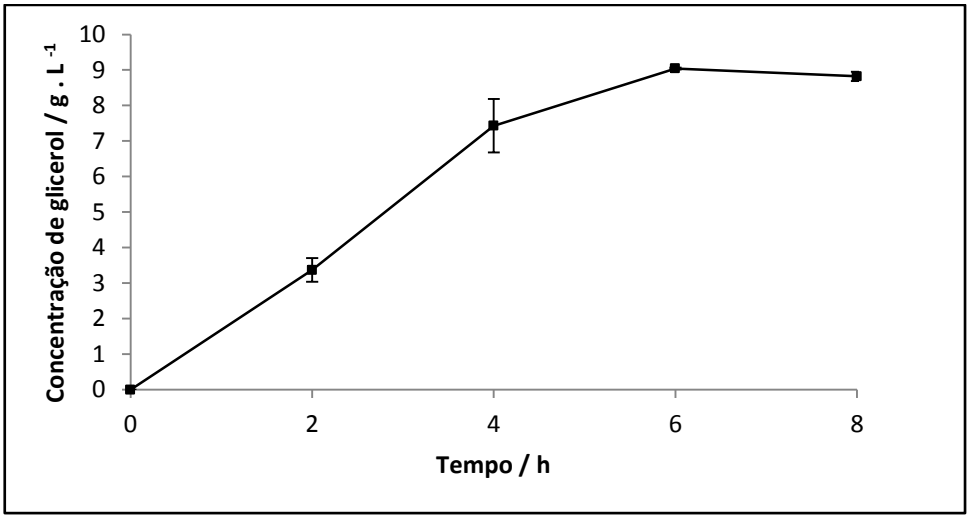


Figura 5.1 – Cinética da fermentação alcoólica de glicose pela levedura S. cerevisiae de panificação, na ausência dos compostos modelo. (a) crescimento microbiano (♦) e pH (+), (b) produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); (c) produção de glicerol (■).

A formação de ácido acético poderia também explicar a queda do pH. Porém, em nosso experimento, a quantidade de ácido acético ficou abaixo do limite de detecção para quase todas as amostras. Apenas uma amostra, coletada após 6 h de fermentação, apresentou uma pequena quantidade deste subproduto, na concentração de 0,5 $g.L^{-1}$ (0,3% de conversão da glicose). Essa concentração corresponde a 0,0083 $mol.L^{-1}$ de ácido acético.

A Figura 5.1(a) mostra ainda o crescimento da levedura durante a fermentação. Nesta fermentação, iniciou-se com a concentração de células, em base seca, de 19,9 ± 0,6 $g.L^{-1}$ e, no tempo de 6 h, essa concentração foi de 28 ± 1 $g.L^{-1}$, um aumento de 40 ± 2 % em relação à massa inicial de células. Para o tempo de 8 h, o valor da biomassa se mostrou menor, porém dentro do erro experimental.

Apesar de se usar um anti-espumante para a realização da fermentação, ocorreu um pouco de espuma no meio fermentativo, o que dificultou a coleta das amostras, implicando em desvios relativamente altos para os dados de biomassa e, especialmente para o tempo de 4 h, quando a fermentação ainda está bastante intensa. Todos os valores apresentaram desvios maiores que nos outros tempos de coleta de amostras.

A Figura 5.1(b) mostra as variações das concentrações de glicose e de etanol no processo fermentativo da levedura de panificação. Observa-se que, com apenas 6 h de fermentação, a levedura consumiu toda a glicose do meio e atingiu a máxima concentração de etanol. Esse dado serviu de referência para os cálculos dos parâmetros de fermentação (item 4.8), que foram então efetuados para o tempo de 6 h de fermentação em todos os experimentos realizados.

A Tabela 5.1 contém os resultados dos parâmetros de fermentação deste experimento.

Tabela 5.1– Resultados da glicose residual em massa e percentual, da concentração de etanol, dos rendimentos dos produtos (massa de células, glicerol, ácido acético e etanol) em relação à glicose consumida e da produtividade volumétrica de etanol. Valores calculados para o tempo de 6 h de fermentação, para o teste inicial sem adição dos compostos modelo.

Parâmetros de fermentação	**Valores obtidos para o experimento sem adição dos compostos modelo**
Glicose residual (g)	0,9 ± 0,3
Glicose residual (%)	0,5 ±0,2 %
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	64,4 ± 0,5
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	10,73 ± 0,08
Fator de conversão de glicose em células $Y_{x/s}$ ($g.g^{-1}$)	0,046 ± 0,007
Desvio de glicose para glicerol $Y_{glicer/s}$ ($g.g^{-1}$)	0,0514 ± 0,0002
Desvio de glicose para ácido acético $Y_{ác.\ acético/s}$ ($g.g^{-1}$)	0,003*
Fator de conversão de glicose em etanol $Y_{et/s}$ ($g.g^{-1}$)	0,366 ± 0,003
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	71,8 ± 0,6 %

*Apenas uma amostra da triplicata teve a quantidade de ácido acético detectada, por isso não é apresentado o desvio neste caso.

O fator de conversão de glicose em etanol foi de 71,6 ± 0,8 % em relação ao rendimento teórico. Esse valor é bem menor do obtido por Basso et al. (2008). Esses autores obtiveram um rendimento para a levedura de panificação da ordem de 88 ± 1%, utilizando um meio contendo 200 $g.L^{-1}$ de açúcares (sacarose, glicose e frutose, valor convertido em glicose equivalente), que foi adicionado em três porções iguais espaçadas por 1,5 h após a adição da suspensão de células, cuja concentração foi de 33% (*m/v*) em base úmida e temperatura de 33°C. O valor é uma média obtida após 5 ciclos de fermentação, nos quais a levedura era reaproveitada na batelada seguinte, após lavagem com ácido sulfúrico (pH = 5; 1 h) e centrifugação. Larsson *et al..* (2000) obtiveram um rendimento de 79 ± 2% em condições bastante diferenciadas. Eles iniciaram a fermentação com 0,16 $g.L^{-1}$ de células e 20 $g.L^{-1}$ de glicose, em meio sintético. A fermentação foi analisada por 24 h, e a produtividade, calculada para 8 h de fermentação, foi de 0,67 ± 0,09 $g.L^{-1}.h^{-1}$. O baixo valor da produtividade, comparado com nosso experimento, pode ser explicado pelo baixo valor da concentração inicial de levedura, que resulta em um tempo elevado de fermentação. Nos testes

posteriores, como será mostrado, conseguiu-se melhorar o fator de conversão de glicose em etanol dos nossos experimentos.

5.1.2. Testes de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* de panificação, com adição dos compostos modelo

Os próximos itens trazem os resultados para os testes de fermentação com a adição dos compostos fenólicos.

5.1.2.1. Avaliação da variação do pH

O pH inicial foi ajustado para o meio antes da distribuição do volume de 50 mL nos erlenmeyers e, por isso, o valor do pH inicial representa uma única medida. O pH final foi medido em cada erlenmeyer da triplicata e o resultado é a média desses valores. A Tabela 5.2 mostra todos os valores de pH dos tempos inicial e após 6 h de fermentação, assim como a variação do pH.

O pH inicial foi ajustado entre 4,5 ± 0,1 e 5,0 ± 0,1. Em todos os testes realizados, o valor do pH decresceu em relação ao inicial. O menor valor de pH final encontrado foi de 3,33 ± 0,09 para o controle que acompanhou os experimentos com adição do *p*-hidroxibenzaldeído. O maior valor de pH final foi de 3,85 ± 0,08 para o teste com adição de 1,0 $g.L^{-1}$ de ácido ferúlico. As causas da diminuição do pH já foram discutidas no item 5.1.1 e a adição dos compostos modelo não mostrou alteração significativa em relação às fermentações sem adição dos compostos modelo, como pode ser analisado pela coluna “Variação do pH” da Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Valores do pH para os testes Controle e respectivos testes com adição dos compostos modelo nas concentrações de 0,6 e 1,0 g.L^{-1}.

Compostos modelo	Concentração do composto modelo (g . L^{-1})	pH inicial	pH após 6h de fermentação	Variação do pH
	0,0	4,51	3,33 ± 0,09	- 1,18 ± 0,09
***p*-hidroxibenzaldeído**	0,6	4,48	3,50 ± 0,02	- 0,98 ± 0,02
	1,0	4,46	3,38 ± 0,04	- 1,08 ± 0,04
	0,0	4,61	3,5 ± 0,1	- 1,1 ± 0,1
vanilina	0,6	4,59	3,59 ± 0,04	- 1,00 ± 0,04
	1,0	4,51	3,61 ± 0,04	- 0,90 ± 0,04
	0,0	4,51	3,43 ± 0,02	- 1,08 ± 0,02
siringaldeído	0,6	4,49	3,54 ± 0,05	- 0,95 ± 0,05
	1,0	4,55	3,65 ± 0,06	- 0,90 ± 0,06
	0,0	4,55	3,43 ± 0,04	- 1,12 ± 0,04
ácido *p*-hidroxibenzoico	0,6	4,49	3,4 ± 0,1	- 1,1 ± 0,1
	1,0	4,51	3,56 ± 0,06	- 0,95 ± 0,06
	0,0	4,57	3,48 ± 0,07	- 1,09 ± 0,07
ácido vanílico	0,6	4,59	3,58 ± 0,06	- 1,01 ± 0,06
	1,0	4,49	3,70 ± 0,08	- 0,79 ± 0,08
	0,0	4,55	3,44 ± 0,05	- 1,11 ± 0,05
ácido siríngico	0,6	4,49	3,56 ± 0,04	- 0,93 ± 0,04
	1,0	4,45	3,50 ± 0,02	- 0,95 ± 0,02
	0,0	4,63	3,61 ± 0,05	- 1,02 ± 0,05
ácido cumárico	0,6	4,53	3,6 ± 0,1	- 0,9 ± 0,1
	1,0	4,45	3,60 ± 0,05	- 0,85 ± 0,05
	0,0	4,51	3,46 ± 0,02	- 1,05 ± 0,02
ácido ferúlico	0,6	4,47	3,68 ± 0,03	- 0,79 ± 0,03
	1,0	4,53	3,85 ± 0,08	- 0,68 ± 0,08

5.1.2.2. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de *p*-hidroxibenzaldeído nas concentrações de 0,6 e 1,0 g.L^{-1}

A Tabela 5.3 mostra os resultados experimentais dos parâmetros calculados para avaliar as fermentações para os experimentos sem e com adição de *p*-hidroxibenzaldeído nas concentrações de 0,6 e 1,0 g.L^{-1}.

Tabela 5.3 – Resultados para os experimentos sem e com adição de *p*-hidroxibenzaldeído nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de *p*-hidroxibenzaldeído ($g . L^{-1}$)**		
	0,0	**0,6**	**1,0**
Glicose residual (g)	27 ± 6	41 ± 3	34 ± 2
Glicose residual (%)	15 ± 3	22 ± 1	19 ± 1
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	60,2 ± 0,5	59 ± 3	59 ± 4
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	10,03±0,09	9,8±0,5	9,9±0,7
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,04 ± 0,01	0,045 ± 0,005	0,040 ± 0,007
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,046 ± 0,005	0,048 ± 0,003	0,048 ± 0,003
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,0052 ± 0,0003	0,0060 ± 0,0003	0,0058 ± 0,0004
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,39 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,39 ± 0,03
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	76 ± 2	80 ± 2	77 ± 3

A adição do *p*-hidroxibenzaldeído ao meio fermentativo dificultou um pouco o consumo do substrato pela levedura, o que pode ser observado pela glicose residual percentual um pouco mais elevada que no controle.

Comparando-se os testes sem e com adição de *p*-hidroxibenzaldeído, percebeu-se que os parâmetros pouco se alteraram. Concluiu-se que a adição deste composto, nas concentrações estudadas, não alterou os parâmetros avaliados, dados os desvios-padrão associados aos mesmos. O único parâmetro que foi levemente alterado foi o desvio de glicose para a produção de ácido acético no experimento com 0,6 $g.L^{-1}$ de *p*-hidroxibenzaldeído, sendo esse aumento de 15 ± 8 %.

Esses dados são importantes porque se pode concluir que o *p*-hidroxibenzaldeído não é inibidor, por si só, da fermentação alcoólica pela levedura de *S. cerevisiae* de panificação e não seria obstáculo em uma

fermentação utilizando-se um hidrolisado celulósico que contenha o *p*-hidroxibenzaldeído nas concentrações estudadas.

5.1.2.3. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de vanilina nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$

A Tabela 5.4 mostra os resultados experimentais dos parâmetros calculados para avaliar as fermentações para um teste controle e dois testes com adição de vanilina nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$.

Tabela 5.4 – Resultados para os experimentos sem e com adição de vanilina nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de vanilina ($g . L^{-1}$)**		
	0,0	**0,6**	**1,0**
Glicose residual (g)	2 ± 1	20 ± 1	29 ± 3
Glicose residual (%)	1,1 ± 0,6	10,8 ± 0,6	15 ± 2
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	78 ± 1	68 ± 2	67 ± 3
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	13,0 ± 0,2	11,3 ± 0,4	11,2 ± 0,4
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,040 ± 0,004	0,037 ± 0,004	0,050 ± 0,004
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,046 ± 0,004	0,046 ± 0,002	0,048 ± 0,003
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,0049 ± 0,0004	0,0061 ± 0,0003	0,0065 ± 0,0008
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,42 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,42 ± 0,02
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	82 ± 1	79 ± 2	82 ± 2

A adição de vanilina ao meio de fermentação dificultou o consumo de glicose pela levedura, visto que a glicose residual percentual aumentou relativamente ao controle para ambas as concentrações.

A concentração de etanol diminuiu 13 ± 3 % e 14 ± 5 % para as concentrações de vanilina de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$, respectivamente, com queda equivalente na produtividade volumétrica.

O fator de conversão de glicose em células aumentou 25 ± 14 % relativamente ao controle, para a concentração de 1,0 $g.L^{-1}$.

O desvio de glicose para ácido acético aumentou para ambas as concentrações, sendo um aumento de 25 ± 10 % e de 33 ± 18 % para as concentrações de vanilina de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$, respectivamente.

O fator de conversão de glicose em etanol e o desvio de glicose para a produção de glicerol, porém, não se alteraram.

Concluiu-se que a presença da vanilina fez com que a levedura de panificação *S. cerevisiae* fosse menos eficiente no consumo de glicose, provocando uma queda na produtividade volumétrica de etanol e um significativo aumento no desvio de glicose para a produção de ácido acético, indicativos de seu efeito inibitório sobre a fermentação alcoólica.

5.1.2.4. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de siringaldeído nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$

Os resultados na Tabela 5.5 mostraram que, em sua maioria, os parâmetros fermentativos foram mais afetados quando se adicionou o siringaldeído na concentração de 0,6 $g.L^{-1}$ do que quando se adicionou este composto na concentração de 1,0 $g.L^{-1}$. Esse efeito foi observado apenas para este composto dentre os 8 estudados neste trabalho.

Tabela 5.5 – Resultados para os experimentos sem e com adição de siringaldeído nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de siringaldeído ($g . L^{-1}$)**		
	0,0	**0,6**	**1,0**
Glicose residual (g)	8 ± 2	27 ± 3	32 ± 2
Glicose residual (%)	4,5 ± 0,8	14 ± 2	17,3 ± 0,9
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	65,8 ± 0,4	53 ± 1	60 ± 1
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	10,97 ± 0,06	8,9 ± 0,2	10,0 ± 0,2
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,045 ± 0,002	0,037 ± 0,005	0,047 ± 0,008
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,0458 ± 0,0009	0,047 ± 0,002	0,045 ± 0,001
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,00518 ± 0,00008	0,0061 ± 0,0004	0,0058 ± 0,0003
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,371 ± 0,005	0,34 ± 0,01	0,390 ± 0,009
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	72,8 ± 0,9	66 ± 2	76 ± 2

A glicose residual percentual aumentou para ambas as concentrações de siringaldeído no meio fermentativo.

A concentração e a produtividade volumétrica de etanol diminuíram 20 ± 2 % e 9 ± 2 %, para as concentrações de siringaldeído 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$, respectivamente.

A variação observada para o fator de conversão de glicose em células ficou muito pequena quando se leva em consideração a margem de erro dada pelo desvio padrão.

O desvio de glicose para ácido acético elevou-se um pouco em relação ao controle, sendo um aumento de 18 ± 8 % e de 12 ± 6 % para as concentrações de 0,6 e de 1,0 $g.L^{-1}$, respectivamente, efeitos que podem ser considerados iguais, dado a propagação de erro considerada no cálculo dos mesmos.

Apesar da quantidade de ácido acético produzida ser pequena frente à quantidade de etanol, o aumento da produção de ácido acético é muito prejudicial

ao processo industrial. Em uma dorna de 1,0 x 10^6L de mosto, com uma concentração de 180 g.L^{-1} de açúcares fermentescíveis, perder-se-iam cerca de 165 kg de açúcar (considerando o aumento de 18% no desvio de glicose para ácido acético) como desvio de rota para o ácido ao invés do etanol.

Já o fator de conversão de glicose em etanol, apesar de ter diminuído 8 ± 3 % para o experimento com 0,6 g.L^{-1} de siringaldeído, teve uma pequena elevação de 5 ± 3 % quando a concentração foi de 1,0 g.L^{-1}.

Uma explicação para que o aumento da concentração de siringaldeído não afetasse igualmente todos os parâmetros não pode ser avaliado com os dados levantados neste estudo. Porém, fica evidente que a adição de siringaldeído exerce um efeito inibitório relativo ao consumo de glicose, com consequente queda na produtividade volumétrica de etanol.

O aumento do desvio de glicose para a produção de ácido acético, nas fermentações em presença de aldeídos, será discutido juntamente com os dados do perfil fermentativo da levedura *S. cerevisiae* PE-2 no item 5.2.4.

5.1.2.5. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de ácido *p*-hidroxibenzoico nas concentrações de 0,6 e 1,0 g.L^{-1}

A adição do ácido *p*-hidroxibenzoico não provocou alterações significativas nos parâmetros avaliados. Esse resultado também foi obtido quando se adicionou o *p*-hidroxibenzaldeído ao meio fermentativo. Os resultados para os experimentos sem e com adição deste composto estão na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Resultados para os experimentos sem e com adição de ácido *p*-hidroxibenzoico nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de ácido *p*-hidroxibenzoico ($g . L^{-1}$)**		
	0,0	**0,6**	**1,0**
Glicose residual (g)	14 ± 4	11 ± 6	14 ± 3
Glicose residual (%)	8 ± 2	6 ± 3	7 ± 1
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	68 ± 1	67 ± 4	66,2 ± 0,8
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	11,3 ± 0,2	11,1 ± 0,6	11,0 ± 0,1
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,038 ± 0,007	0,041 ± 0,003	0,043 ± 0,002
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,047 ± 0,002	0,046 ± 0,003	0,043 ± 0,002
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,0055 ± 0,0001	0,0050 ± 0,0004	0,0049 ± 0,0002
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,378 ± 0,009
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	76 ± 2	67 ± 4	74,2 ± 0,9

Concluiu-se, portanto, que a adição do ácido *p*-hidroxibenzoico ao meio fermentativo não inibiu a fermentação de glicose a etanol pela levedura *S. cerevisiae* de panificação, resultado importante para a utilização de hidrolisados celulósicos que contenham esse composto.

5.1.2.6. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de ácido vanílico nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$

Os resultados da fermentação na presença do ácido vanílico (Tabela 5.7) mostraram que a glicose residual percentual aumentou significativamente, sendo os aumentos de 47 ± 27 % e 181 ± 41 % para os testes com 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ de ácido vanílico, respectivamente.

Tabela 5.7 – Resultados para os experimentos sem e com adição de ácido vanílico nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de ácido vanílico ($g . L^{-1}$)**		
	0,0	**0,6**	**1,0**
Glicose residual (g)	21 ± 4	31 ± 4	57 ± 4
Glicose residual (%)	11 ± 2	16 ± 2	31 ± 2
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	68 ± 3	59 ± 2	48 ± 2
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	11,3 ± 0,5	9,9 ± 0,3	7,9 ± 0,4
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,039 ± 0,004	0,041 ± 0,004	0,035 ± 0,005
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,048 ± 0,003	0,047 ± 0,002	0,053 ± 0,005
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,0060 ± 0,0003	0,0059 ± 0,0002	0,0073 ± 0,0004
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,40 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,37 ± 0,03
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	79 ± 2	72 ± 2	72 ± 3

Observou-se, ainda, uma diminuição significativa na produção de etanol pela levedura de panificação e em sua produtividade volumétrica. A concentração e a produtividade volumétrica de etanol diminuíram 13 ± 5 % quando se adicionou o ácido vanílico na concentração de 0,6 $g.L^{-1}$, e 29 ± 5 %, para esse composto a 1,0 $g.L^{-1}$.

À exceção do desvio de glicose para ácido acético, quando se adicionou o ácido vanílico 1,0 $g.L^{-1}$, as variações nos valores dos demais parâmetros estão dentro dos limites dados pelos desvios padrão das amostras em triplicata, nas concentrações e nas condições nas quais os experimentos foram realizados.

O aumento do desvio de glicose para ácido acético foi de 22 ± 8 % relativamente ao controle para o ácido vanílico a 1,0 $g.L^{-1}$. O desvio de açúcar para a produção de ácido acético, conforme foi analisado anteriormente (item 5.1.2.4), é indesejável para o processo industrial.

Concluiu-se que a adição de ácido vanílico provocou um efeito inibitório na fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae*, diminuindo o consumo de glicose, a produção e a produtividade volumétrica de etanol. O desvio de glicose para ácido acético aumentou quando o ácido vanílico foi adicionado ao meio na concentração de 1,0 $g.L^{-1}$.

5.1.2.7. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de ácido siríngico nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$

Os resultados experimentais das fermentações sem e com adição de ácido siríngico nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ são mostrados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Resultados para os experimentos sem e com adição de ácido siríngico nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de ácido siríngico ($g . L^{-1}$)**		
	0,0	**0,6**	**1,0**
Glicose residual (g)	12 ± 3	9 ± 3	20,13 ± 0,06
Glicose residual (%)	6 ± 1	5 ± 2	10,93 ± 0,03
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	67 ± 2	68 ± 2	62 ± 1
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	11,1 ± 0,3	11,3 ± 0,3	10,4 ± 0,2
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,036 ± 0,004	0,030 ± 0,001	0,018 ± 0,003
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,047 ± 0,002	0,046 ± 0,002	0,0466 ± 0,0009
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,0056 ± 0,0002	0,0055 ± 0,0003	0,0056 ± 0,0003
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,379 ± 0,009
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	75 ± 2	75 ± 1	74,3 ± 0,9

Correlacionando-se a concentração de etanol e a quantidade de glicose residual, percebeu-se que no meio com adição de 1,0 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico, a produção de etanol e a produtividade volumétrica de etanol foram reduzidas em 8 ± 3 % relativas ao controle, enquanto a glicose residual percentual aumentou em 82 ± 22 %.

A adição do ácido siríngico diminuiu o fator de conversão de glicose para a produção de células. Na concentração de 0,6 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico no meio fermentativo, o efeito foi pequeno. Porém, na concentração de 1,0 $g.L^{-1}$, a presença do ácido siríngico provocou uma queda acentuada nesse fator, que diminuiu 50 ± 15 % relativamente ao controle.

Os desvios de glicose para a produção de glicerol e de ácido acético e o fator de conversão de glicose em etanol, porém, mantiveram-se inalterados.

Concluiu-se que a dificuldade para consumir a glicose resultou em diminuição no crescimento de células e na produção de etanol em 6 h de fermentação. Consequentemente, a produtividade volumétrica de etanol decresceu.

5.1.2.8. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de ácido cumárico nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$

A adição de ácido cumárico ao meio fermentativo, nas concentrações de 0,6 e de 1,0 $g.L^{-1}$, provocou um efeito inibitório significativo na fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* de panificação, como pode ser analisado a partir dos dados na Tabela 5.9.

A dificuldade no consumo de glicose gerou uma glicose residual percentual elevada para as duas concentrações avaliadas. Com 0,6 $g.L^{-1}$ de ácido cumárico no meio fermentativo, a glicose após 6 h de fermentação foi cerca de 2 a 3 vezes maior (+ 188 ± 71 %) que no controle e para a concentração de 1,0 $g.L^{-1}$ foi cerca de 3 a 4 vezes maior (+ 298 ± 105 %).

A produção de etanol após 6 h de fermentação decresceu com a presença desse composto, sendo 22 ± 3 % e 31 ± 1 % menor que a produção do controle,

respectivamente, para as concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$. A produtividade volumétrica, dessa forma, também decresceu nas mesmas proporções.

Tabela 5.9 – Resultados para os experimentos sem e com adição de ácido cumárico nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de ácido cumárico ($g . L^{-1}$)**		
	0,0	**0,6**	**1,0**
Glicose residual (g)	16 ± 5	48,9 ± 0,1	68,5 ± 0,8
Glicose residual (%)	9 ± 3	25,92 ± 0,07	35,8 ± 0,4
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	68,2 ± 0,7	53 ± 2	47,0 ± 0,6
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	11,4 ± 0,1	8,8 ± 0,3	7,8 ± 0,1
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,059 ± 0,004	0,030 ± 0,009	0,026 ± 0,005
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,048 ± 0,002	0,055 ± 0,003	0,063 ± 0,005
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,0063 ± 0,0001	0,0062 ± 0,0004	0,0061 ± 0,0001
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,40 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,02
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	78 ± 1	74 ± 1	75 ± 2

A adição de ácido cumárico, em ambas as concentrações, diminuiu o fator de conversão de glicose em células. Analisando-se os desvios padrão dessas medidas, pode-se dizer que o efeito foi semelhante, não se alterando com o aumento da concentração do ácido cumárico (-49 ± 17 % e - 56 ± 12 %).

O desvio de glicose para a produção de glicerol ocorreu em maior extensão na fermentação em presença de 1,0 $g.L^{-1}$ de ácido cumárico (+ 31 ± 11 %).

O fator de conversão de glicose em etanol e o desvio de glicose para a produção de ácido acético permaneceram inalterados, dentro dos limites dos desvios das amostras.

Concluiu-se que o ácido cumárico exerceu forte efeito inibitório no consumo de glicose, na produção de etanol, na produtividade volumétrica de etanol e no fator de conversão de glicose em células, nesse caso, sendo mais significativo

quando adicionado na concentração de 1,0 $g.L^{-1}$. A presença do ácido cumárico, porém, não afetou fator de conversão de glicose em etanol e nem o valor do desvio de glicose para a produção de ácido acético.

5.1.2.9. Fermentação alcoólica pela levedura de panificação, com adição de ácido ferúlico nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$

O último composto avaliado foi o ácido ferúlico, cujos resultados dos parâmetros fermentativos estão na Tabela 5.10. Dentre todos os compostos avaliados, foi o que se mostrou de maior caráter inibitório à fermentação de glicose a etanol pela *S. cerevisiae* de panificação.

Tabela 5.10 – Resultados para os experimentos sem e com adição de ácido ferúlico nas concentrações de 0,6 $g.L^{-1}$ e 1,0 $g.L^{-1}$. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida; e à produtividade volumétrica de etanol. Resultados após 6 h de fermentação.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de ácido ferúlico (g . L^{-1})**		
	0,0	**0,6**	**1,0**
Glicose residual (g)	15,0 ± 0,8	95 ± 2	128 ± 5
Glicose residual (%)	8,1 ± 0,4	51,1 ± 0,9	70 ± 3
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	66 ± 1	34,8 ± 0,5	22 ± 2
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	11,0 ± 0,2	5,80 ± 0,09	3,7 ± 0,3
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,052 ± 0,004	0,044 ± 0,008	0,026 ± 0,006
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,046 ± 0,002	0,068 ± 0,004	0,08 ± 0,01
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,0055 ± 0,0001	0,008*	ND
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,386 ± 0,009	0,38 ± 0,02	0,39 ± 0,05
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	75,7 ± 0,9	75 ± 2	77 ± 5

ND = não detectado na leitura do CLAE.
* leitura detectada em apenas uma amostra.

A glicose residual foi muito elevada para os experimentos com adição de ácido ferúlico. Relativamente ao controle, a glicose residual foi cerca de 6 vezes maior no experimento com 0,6 $g.L^{-1}$ e de 8 a 9 vezes maior na concentração de 1,0 $g.L^{-1}$.

A concentração de etanol após 6 h de fermentação e sua produtividade volumétrica decresceram 47 ± 2 % e 67 ± 4 % para as concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$, comparadas ao controle.

O fator de conversão de glicose em células mostrou um decréscimo com o aumento da concentração de ácido ferúlico, sendo efetivamente significativo para a fermentação com 1,0 $g.L^{-1}$ de ácido ferúlico, com decréscimo de 50 ± 14 % relativo ao controle.

O desvio de glicose para glicerol aumentou 48 ± 10 % e 74 ± 22 % relativo ao controle para as fermentações com 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ de ácido ferúlico, respectivamente.

O fator de conversão de glicose em etanol, porém, não sofreu alteração significativa. Pode-se concluir que a utilização da glicose pela levedura priorizou a obtenção de energia, visto que a produção de etanol se manteve para a massa de glicose consumida.

O ácido acético não foi detectado em 5 das 9 amostras, o que impossibilitou a análise do desvio de glicose para ácido acético nesses experimentos.

Concluiu-se que a adição de ácido ferúlico, em ambas as concentrações, inibiu o consumo de glicose e aumentou o desvio de glicose para a produção de glicerol. A produção de etanol após 6 h de fermentação caiu, fazendo com que a produtividade volumétrica decrescesse na mesma proporção. O fator de conversão de glicose em células também foi afetado negativamente, em especial para a concentração de 1,0 $g.L^{-1}$ de ácido ferúlico. A adição de ácido ferúlico, porém, não inibiu o fator de conversão de glicose em etanol.

5.1.2.10. Comparação dos resultados para os parâmetros de fermentação dos 8 compostos fenólicos testados

A Tabela 5.11 mostra os resultados para os parâmetros de fermentação, comparativamente aos seus respectivos controles, para facilitar a análise do comportamento de cada parâmetro relativo aos oito compostos fenólicos testados.

A partir dessa tabela, é importante ressaltar alguns resultados. Para todos os compostos investigados, nenhum inibiu o fator de conversão de glicose em etanol. Alguns, porém, diminuíram o fator de conversão de glicose em células ou até mesmo aumentaram seu valor. Esse resultado está de acordo com a literatura, como será discutido na próxima parte deste capítulo, que os inibidores afetam mais o fator de conversão de glicose em células do que o fator de conversão de glicose em etanol.

Outro resultado importante que é ressaltado pela Tabela 5.11 é de que os parâmetros que são função do tempo, como o consumo de glicose (avaliado pela glicose residual) e a produtividade volumétrica de etanol, são mais afetados do que os fatores de conversão e os desvios para os subprodutos. Porém, no caso das fermentações na presença dos aldeídos (*p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído), o desvio de glicose para ácido acético aumentou.

Tabela 5.11 – Resumo dos resultados para a comparação dos valores dos parâmetros de fermentação relativos a cada controle. Os valores mostrados indicam a variação percentual do valor em comparação com o controle. Todos os cálculos foram realizados para o tempo de 6 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* de panificação.

Variação dos parâmetros de avaliação das fermentações relativamente ao controle de cada experimento

Composto modelo	Concentração ($g.L^{-1}$)	Rendimento de ($g.g^{-1}$ de glicose)				Concentração ($g.L^{-1}$) e produtividade volumétrica de etanol ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	Glicose residual (% da glicose inicial)
		Massa de células	Glicerol	Ácido acético	Etanol		
p-hidroxibenzaldeído	0,6	----------	----------	+ 15 ± 8 %	----------	----------	----------
	1,0	----------	----------	----------	----------	----------	----------
Vanilina	0,6	----------	----------	+ 25 ± 10 %	----------	- 13 ± 3 %	+ 881± 487 %
	1,0	+ 25 ± 14%	----------	+ 33 ± 18 %	----------	- 14 ± 5 %	+ 1264 ± 715 %
Siringaldeído	0,6	----------	----------	+ 18 ± 8 %	- 8 ± 3 %	- 20 ± 2 %	+ 211 ± 61%
	1,0	----------	----------	+ 12 ± 6 %	+ 5 ± 3 %	- 9 ± 2 %	+ 284 ± 57%
Ácido p-hidroxibenzoico	0,6	----------	----------	----------	----------	----------	----------
	1,0	----------	----------	----------	----------	----------	----------
Ácido vanílico	0,6	----------	----------	----------	----------	- 13 ± 5 %	+ 47 ± 27 %
	1,0	----------	----------	22 ± 8 %	----------	- 29 ± 5 %	+ 181 ± 41 %
Ácido siríngico	0,6	----------	----------	----------	----------	----------	----------
	1,0	- 50 ± 15 %	----------	----------	----------	- 8 ± 3 %	+ 82 ± 22 %
Ácido cumárico	0,6	- 49 ± 17 %	+ 13 ± 8 %	----------	----------	- 22 ± 3 %	+ 188 ± 71 %
	1,0	- 56 ± 12 %	+ 31 ± 11 %	----------	----------	- 31 ± 1 %	+ 298 ± 105 %
Ácido ferúlico	0,6	----------	+ 48 ± 10 %	----------	----------	- 47 ± 2 %	+ 531± 29 %
	1,0	- 50 ± 14 %	+ 74 ± 22 %	----------	----------	- 67 ± 4 %	+ 764 ± 53 %

---------- indica que não houve variação significativa.

5.2. Experimentos de fermentação de glicose a etanol, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2

Nesta segunda parte deste capítulo, são apresentados os resultados para a o perfil fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, sem e com adição dos compostos modelo.

Primeiramente, serão apresentados os resultados dos parâmetros de operação do espectrômetro de massas, otimizados para cada composto fenólico em estudo.

Em seguida, apresentar-se-ão os resultados dos ensaios realizados para verificar se há alguma transformação dos compostos fenólicos quando submetidos ao meio fermentativo, porém sem a presença da levedura (sem inocular).

Nas fermentações de glicose a etanol utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, além dos parâmetros apresentados no item 4.8, avaliou-se também a variação da concentração dos compostos fenólicos. Esses resultados são apresentados separadamente para cada composto.

Para cada experimento, ao qual se adicionaram os compostos fenólicos, serão mostrados os resultados da identificação dos produtos de biotransformação dos mesmos. Alguns desses produtos puderam também ser quantificados.

5.2.1. Identificação dos compostos fenólicos nos cromatogramas de íons totais pelos seus espectros de massas

Os resultados dos parâmetros otimizados para a detecção dos compostos modelo, por espectrometria de massas a partir das soluções padrão, são apresentados na Tabela 5.12.

Tabela 5.12 – Condições otimizadas para identificação dos compostos modelo por espectrometria de massas.

Composto	Declustering Potential (V)	Entrance potential (V)	Cell entrance Potential (V)
***p*-hidroxibenzaldeído**	- 50	- 3,5	- 12
Vanilina	- 25	- 6,0	- 12
Siringaldeído	- 35	- 3,0	- 12
Ácido *p*-hidroxibenzoico	- 30	- 6,0	- 8
Ácido vanílico	- 30	- 7,5	- 10
Ácido siríngico	- 35	- 8,5	- 10
Ácido cumárico	- 30	- 6,5	- 8
Ácido ferúlico	- 30	- 7,0	- 14

A partir dessas condições otimizadas, os compostos foram identificados nos cromatogramas de íons, no modo negativo de ionização, com *m/z* referente ao íon $[M-H]^-$, apresentando os tempos de retenção conforme Tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Valores da massa molar dos compostos modelo, do *m/z* referente ao seu íon $[M-H]^-$ no modo negativo de ionização e seus respectivos tempos de retenção.

Composto	Massa molar ($g.mol^{-1}$)	*m/z*	Tempo de retenção (min)
***p*-hidroxibenzaldeído**	122,0	120,9	8,8
Vanilina	152,0	151,1	11,7
Siringaldeído	182,1	181,0	14,1
Ácido *p*-hidroxibenzoico	138,8	137,2	6,0
Ácido vanílico	168,0	167,2	7,5
Ácido siríngico	198,1	196,9	8,2
Ácido cumárico	164,0	163,0	14,0
Ácido ferúlico	194,1	192,9	19,3

5.2.2. Avaliação dos ensaios com os compostos fenólicos (individualmente) no meio fermentativo, sem adição da levedura *S. cerevisiae* PE-2

Os resultados dos ensaios realizados conforme descrito no item 4.6 para verificar se algum dos compostos fenólicos reage com o meio fermentativo são apresentados na Figura 5.2. Para a vanilina, apresentam-se os resultados em termos de área do cromatograma de íons totais. Os valores se referem à concentração inicial e após 6 h de ensaio.

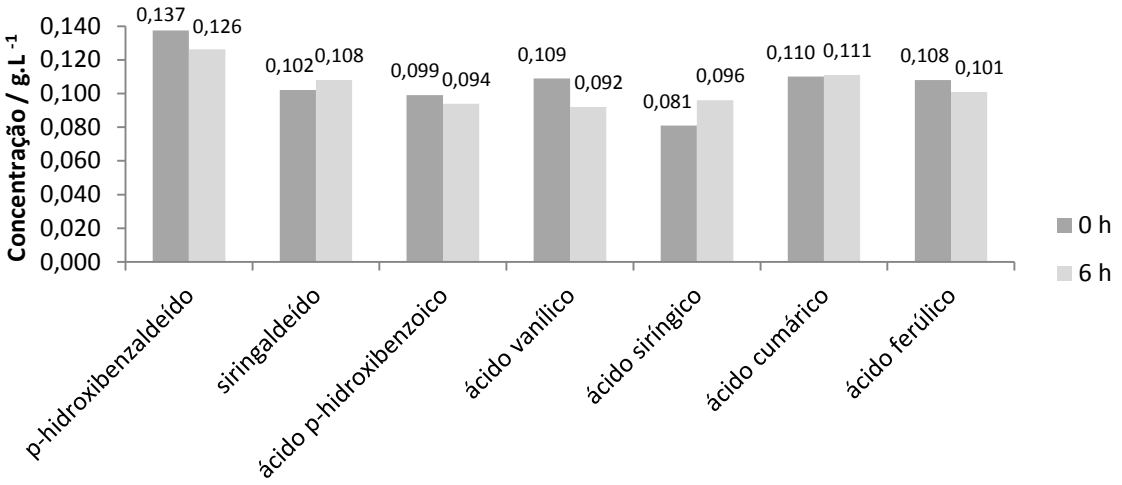


Figura 5.2– Concentrações inicial e final (6 h) dos compostos modelo no meio de fermentação sem adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2.

A partir da Figura 5.2, pode-se concluir que a diferença entre as concentrações inicial e final, para todos os 7 compostos foi mínima. Para a vanilina, a área inicial foi $6{,}6326.10^7$ e a final $7{,}1935.10^7$. Considerou-se aqui um erro experimental estimado em 10%.

Essa inferência decorre da análise dos cromatogramas de íons totais, após 6 h de experimento. Nesses cromatogramas, não se observou outro pico significativo, além do composto de referência e daqueles que se apresentam em todos os cromatogramas, referentes às diversas substâncias presentes no meio de fermentação. Os cromatogramas de íons totais (TIC), de íon extraído (XIC)[3] e

[3] Optou-se pela sigla XIC, ao invés de EIC, devido às legendas dos cromatogramas fornecidas pelo equipamento utilizado.

o espectro de massas para o tempo de amostragem de 6 h, sem adição da levedura, podem ser conferidos no Apêndice B.

5.2.3. Perfil da fermentação pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, sem adição dos compostos modelo

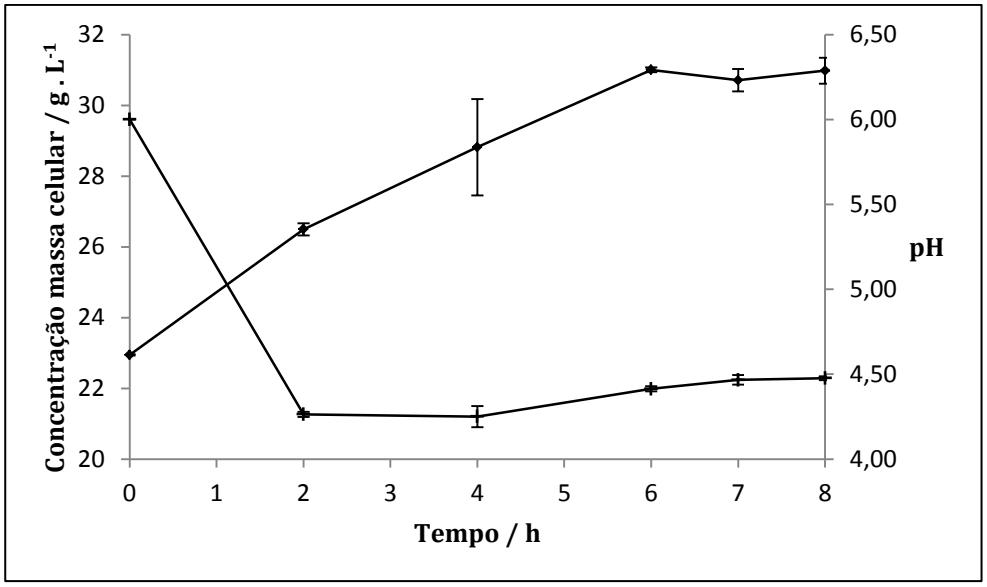
Os resultados para o perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, sem adição dos compostos modelo, são mostrados na Figura 5.3.

Na Figura 5.3 (a), observou-se que o pH decresceu rapidamente, passando de 6,0 para 4,26 ± 0,02 após 2 h, mantendo-se praticamente constante a partir desse tempo, pois o valor máximo atingido após 8 h de fermentação foi igual a 4,48 ± 0,01, apenas 5% maior do que o mínimo atingido após 2 h. No caso dos experimentos com a levedura PE-2, uma das fontes de nitrogênio utilizadas foi a ureia e não o $(NH_4)_2SO_4$. Assim, a diminuição do pH pode ser melhor explicada pela formação de ácido acético como um dos subprodutos de fermentação.

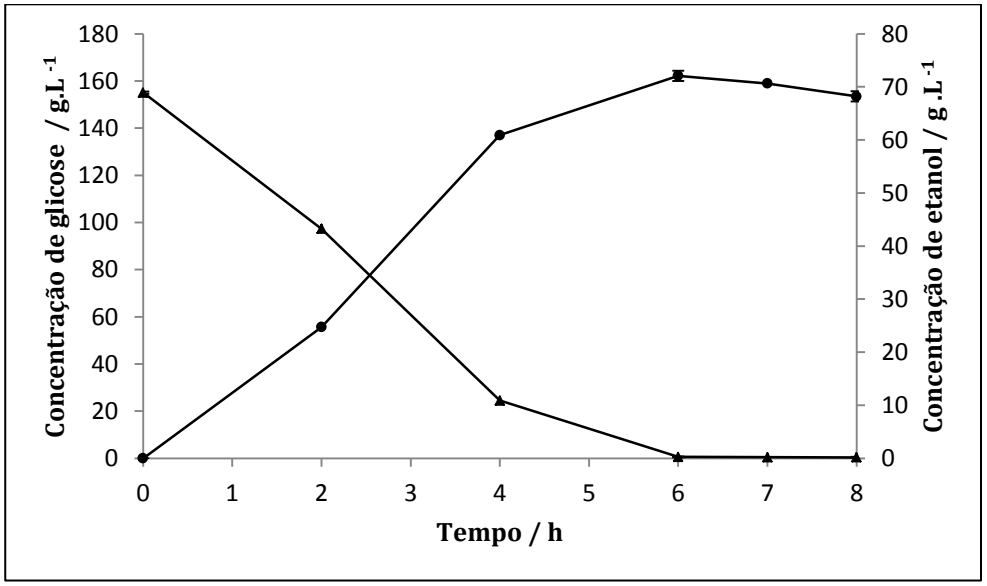
A Figura 5.3 (a) mostra, ainda, o crescimento microbiano durante a fermentação. A massa inicial foi de 22,95 ± 0,02 $g.L^{-1}$, aumentando para 31,00 ± 0,06 $g.L^{-1}$ após 6 h. A partir desse tempo, manteve-se praticamente constante. O aumento observado foi de 35,1 ± 0,4% em relação à massa celular inicial.

A Figura 5.3 (b) mostra a variação da concentração de glicose e de etanol. Assim como o crescimento microbiano, os valores se tornaram praticamente constantes a partir de 6 h de fermentação, com o consumo total da glicose.

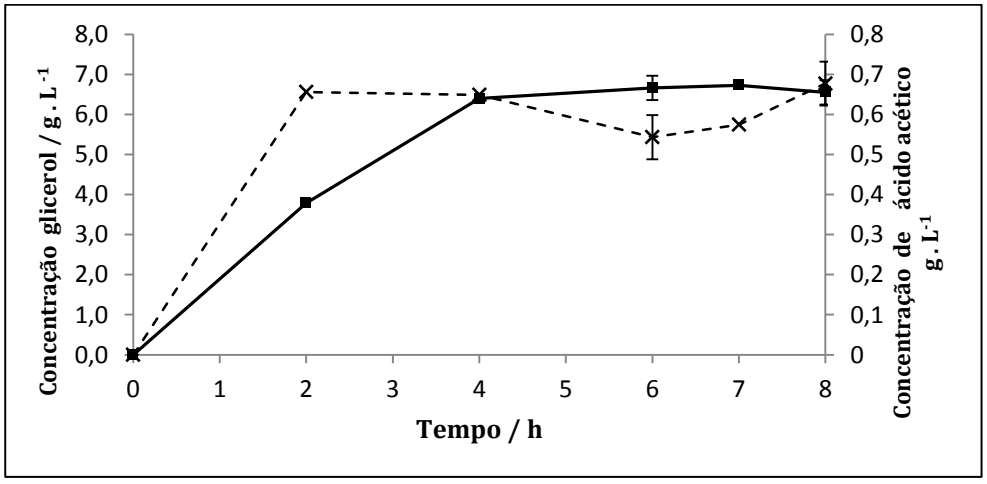
Avaliaram-se também o perfil da formação dos subprodutos glicerol e ácido acético e os resultados são apresentados na Figura 5.3 (c). A formação de glicerol foi intensa até 4 h de fermentação e a partir desse ponto, a concentração desse subproduto torna-se praticamente constante. A formação de ácido acético foi mais intensa apenas nas duas primeiras horas da fermentação. Após 4 h sofreu uma ligeira queda, voltando ao valor obtido após 2 h de fermentação ao final do processo.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.3 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência dos compostos modelo. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (+), **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (**x**-tracejado).

Os valores de referência dos parâmetros de fermentação são mostrados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14– Resultados da glicose residual em massa e percentual, da concentração de etanol, dos rendimentos dos produtos (massa de células, glicerol, ácido acético e etanol) em relação à glicose consumida e da produtividade volumétrica de etanol. Valores calculados para o tempo de 6 h de fermentação, para o teste inicial sem adição dos compostos modelo.

Parâmetros de fermentação	**Valores obtidos para o experimento sem adição dos compostos modelo**
Glicose residual (g)	0,7 ± 0,2
Glicose residual (%)	0,4 ±0,1 %
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	68 ± 1
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	11,4 ± 0,2
Fator de conversão de glicose em células $Y_{x/s}$ ($g.g^{-1}$)	0,0522 ± 0,0005
Desvio de glicose para glicerol $Y_{glicer/s}$ ($g.g^{-1}$)	0,041 ± 0,002
Desvio de glicose para ácido acético $Y_{ác.\ acético/s}$ ($g.g^{-1}$)	0,0033 ± 0,0004
Fator de conversão de glicose em etanol $Y_{et/s}$ ($g.g^{-1}$)	0,441 ± 0,006
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	86,3 ± 0,6 %

A eficiência de conversão de glicose em etanol, 86,3 ± 0,6 % do rendimento teórico, foi menor que o obtido por Basso et al. (2008). Entretanto, foi maior do que o obtido com a levedura de panificação, cuja eficiência de conversão de glicose em etanol, após 6 h de fermentação, foi de 71,6%.

Basso et al. (2008) obtiveram um rendimento para a levedura *S. cerevisiae* PE-2 da ordem de 92 ± 1 %. Eles utilizaram um meio contendo 200 $g.L^{-1}$ de açúcares (sacarose, glicose e frutose, valor convertido em glicose equivalente). Os açúcares foram adicionados em três porções iguais, espaçadas por 1,5 h, após a adição da suspensão de células, cuja concentração inicial foi de 33% (m/v) em base úmida e temperatura de 33°C. O valor foi uma média obtida após 5 ciclos de fermentação, nos quais a levedura era reaproveitada na batelada seguinte, após lavagem com ácido sulfúrico (pH = 5; 1 h) e centrifugação.

5.2.4. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de *p*-hidroxibenzaldeído na concentração de 0,1 g.L^{-1}

O estudo do perfil fermentativo de glicose a etanol pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, sem e com adição de *p*-hidroxibenzaldeído, pode ser analisada a partir das curvas da Figura 5.4.

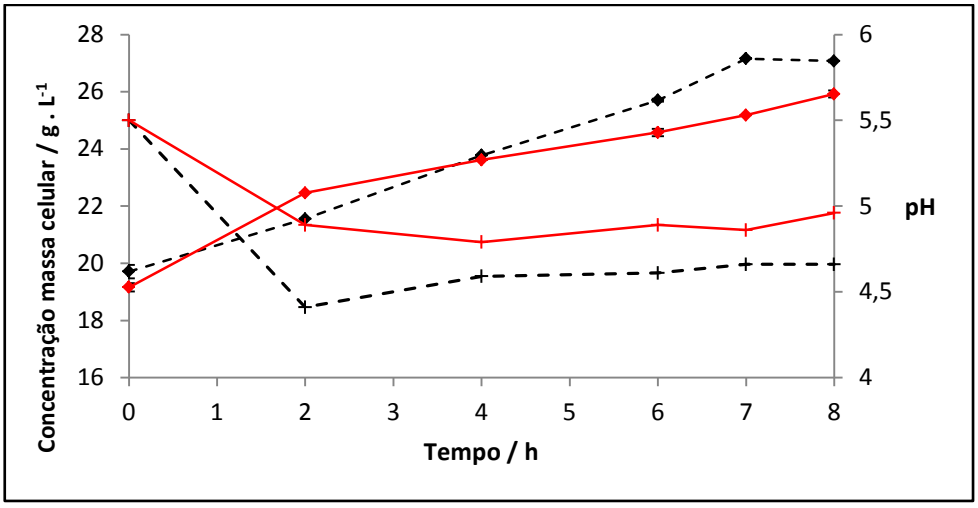
Os dois meios iniciaram com pH = 5,5. Após 2 h de fermentação, observou-se uma queda neste valor, nos dois testes, sendo esta um pouco mais acentuada para o teste controle. Após 4 h de fermentação, pode-se considerar que o pH dos dois testes permaneceu praticamente constante (Figura 5.4 (a)).

O crescimento celular mostrou-se diferente, durante todo o experimento, para os dois testes realizados (Figura 5.4 (a)). A massa inicial de células do teste controle foi ligeiramente maior e o crescimento até 7 h de fermentação seguiu um comportamento praticamente linear, ou seja, uma taxa de crescimento constante, estabilizando-se a partir desse instante.

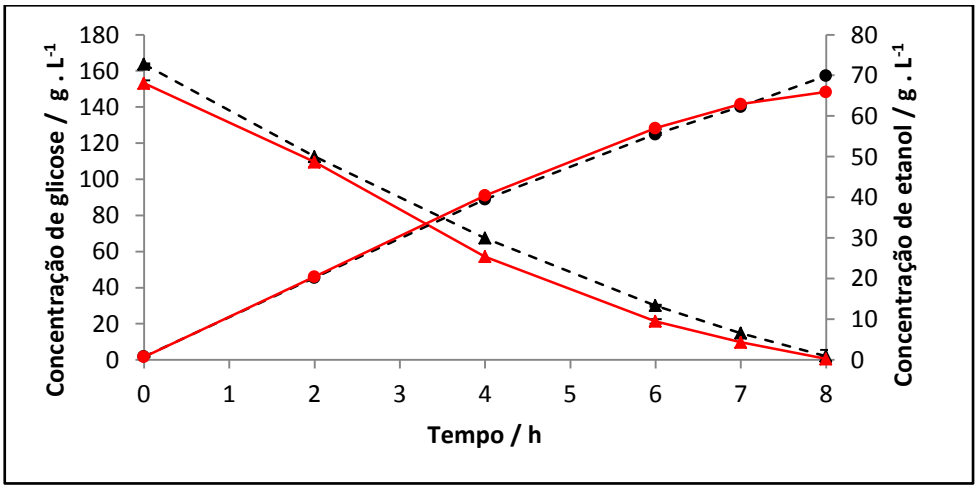
O crescimento celular do teste com 0,1 g.L^{-1} de *p*-hidroxibenzaldeído apresentou uma taxa maior até 2 h de fermentação e, a partir desse instante, uma taxa menor em relação às duas primeiras horas e também em relação ao controle. A massa de células aumentou até o último tempo de amostragem.

A Figura 5.4 (b) mostra que a glicose foi totalmente consumida após 8 h nos dois testes. É provável que a adição de 0,1 g.L^{-1} de *p*-hidroxibenzaldeído provocou um aumento do consumo de glicose para produzir massa de células nas duas primeiras horas, conforme foi analisado a partir da Figura 5.4 (a). Após 2 h, a maior taxa de consumo de glicose resultou em maior taxa de produção de etanol, mas não de massa de células, cujo aumento foi mais lento no restante do processo fermentativo do que nas duas primeiras horas.

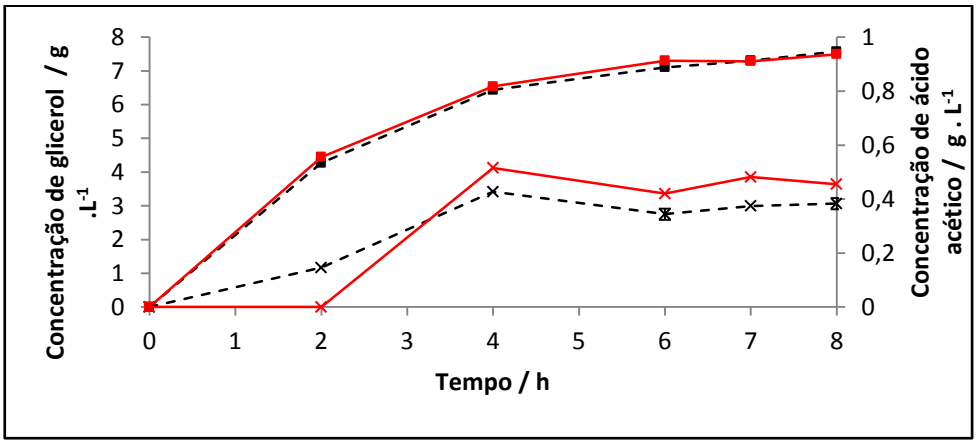
A formação de glicerol, Figura 5.4 (c), foi muito semelhante nos dois testes. Para o ácido acético, porém, observou-se que ocorreu um abrupto aumento de ácido acético logo após 2 h de fermentação. Esse dado será, mais à frente (Figura 5.6), correlacionado com a bioconversão do *p*-hidroxibenzaldeído.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.4 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura S. cerevisiae PE-2, na ausência **(tracejado)** e presença de 0,1 g.L^{-1} de ***p*-hidroxibenzaldeído**; **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (**+**), **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (**x**).

A Tabela 5.15 mostra os resultados experimentais dos parâmetros calculados para avaliar as fermentações para os testes controle e com adição de *p*-hidroxibenzaldeído na concentração de 0,1 g.L^{-1}. Analisando-se o valor da

glicose residual, pode-se dizer que esse substrato foi totalmente consumido após 8 h de fermentação e a produção máxima de etanol ocorreu nesse tempo. Assim, os parâmetros foram calculados para 8 h de processo.

Tabela 5.15 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de *p*-hidroxibenzaldeído. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 8 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2.

Parâmetros de fermentação	**Concentração *p*-hidroxibenzaldeído (g . L^{-1})**	
	0,0	**0,1**
Glicose residual (g)	2 ± 2	0,6 ± 1
Glicose residual (%)	1 ± 1%	0,4 ± 0,8%
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	69,9 ± 0,2	65,9 ± 0,3
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	8,74 ± 0,06	8,24 ± 0,04
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,046 ± 0,002	0,044 ± 0,002
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,047 ± 0,001	0,049 ± 0,001
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,0024 ± 0,0001	0,0030 ± 0,0001
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,43 ± 0,01	0,427 ± 0,007
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	83,6 ± 0,9	83,8 ± 0,7

Quanto à concentração de etanol e sua produtividade volumétrica, os dados obtidos mostram que elas diminuíram 5,7% em relação ao controle. Essa variação é pequena e pode ser explicada pela pequena diferença na concentração inicial de glicose, que foi de 164 ± 3 e de 153 ± 2 $g.L^{-1}$, uma diferença de 11 $g.L^{-1}$. Considerando-se o fator de conversão de glicose a etanol calculado de 0,43 $g.\ g^{-1}$, esperava-se uma diferença de 4,73 $g.L^{-1}$ na concentração final de etanol e encontrou-se uma diferença de 4,0 $g.L^{-1}$.

A adição de *p*-hidroxibenzaldeído aumentou o desvio de glicose para a produção de ácido acético em 25 ± 6 % em relação ao controle. Após 8 h de fermentação, a concentração de ácido acético foi de 0,38 ± 0,02 e de 0,48 ± 0,02

g.L^{-1} para o controle e para o ensaio com adição do *p*-hidroxibenzaldeído, respectivamente.

Neste trabalho, avaliou-se a variação da concentração do *p*-hidroxibenzaldeído durante a fermentação alcoólica. Procurou-se identificar e quantificar, também, seus prováveis produtos de biotconversão: o ácido *p*-hidroxibenzoico e o álcool *p*-hidroxibenzílico.

Durante o processo fermentativo, a levedura *S. cerevisiae* PE-2 foi capaz de transformar o *p*-hidroxibenzaldeído muito rapidamente. A Figura 5.5 mostra o consumo do *p*-hidroxibenzaldeído e formação do ácido *p*-hidroxibenzoico em função do tempo.

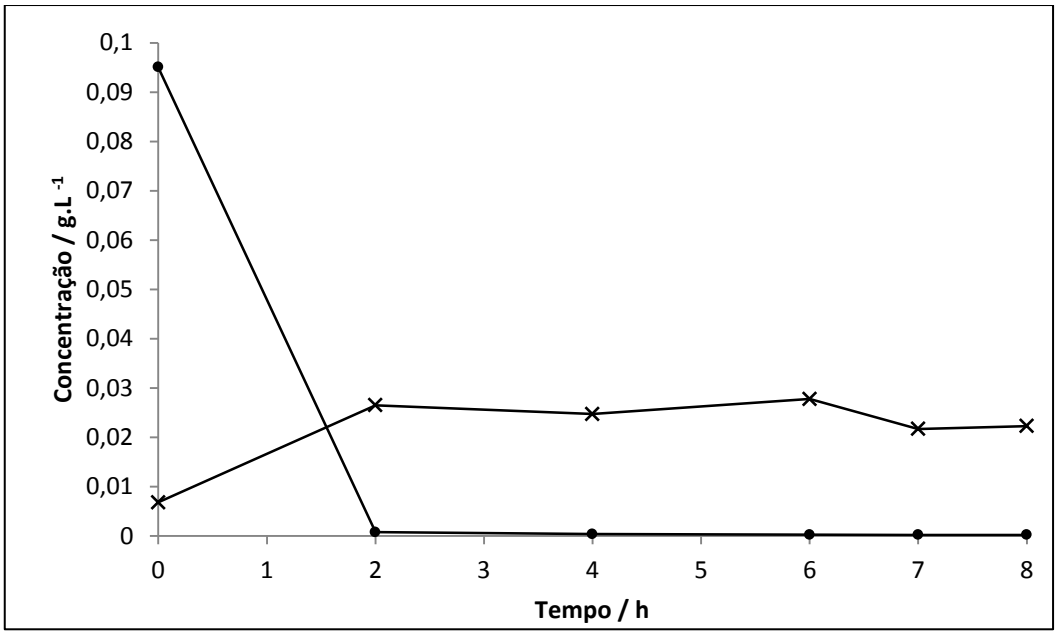


Figura 5.5 – Concentração *p*-hidroxibenzaldeído (●) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e formação do ácido *p*-hidroxibenzoico (**x**). Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 g.L^{-1} de *p*-hidroxibenzaldeído.

A análise quantitativa (modo negativo de ionização) no tempo inicial resultou no valor de concentração de 0,0951 g.L^{-1}. Em 2 h de fermentação, apesar de ainda ser detectado, o *p*-hidroxibenzaldeído estava presente no meio fermentativo em quantidades traço, da ordem de 0,0008 g.L^{-1}.

Analisando-se o espectro de massas, detectou-se o seu produto de oxidação, o ácido *p*-hidroxibenzoico, em *m/z* 137,2 e tempo de retenção 6,0 min, conforme o padrão analisado para este composto (Apêndice C).

A quantidade do ácido formada, porém, não corresponde à quantidade consumida do aldeído correspondente.

Devido à possibilidade de reações de redução, sendo o principal produto esperado o álcool *p*-hidroxibenzílico (124,1 g.mol^{-1}), realizaram-se análises no modo positivo de ionização. Nessas análises, destacou-se a presença de um novo pico em 3,5 min, de *m/z* 107,1. O fragmento em *m/z* 107,1 é originado pela eliminação de uma molécula de água e consequente formação de um carbocátion benzílico, altamente estável.

A Figura 5.6 mostra o cromatograma de íons totais (TIC) no modo positivo, o espectro de íon extraído (XIC) para o álcool *p*-hidroxibenzílico, com varredura entre *m/z* 106 e 107,5 e o seu espectro de massas no tempo de 3,5 min. Os espectros de íons fragmento do *p*-hidroxibenzaldeído e de seus produtos de oxirredução são mostrados no Apêndice C.1.

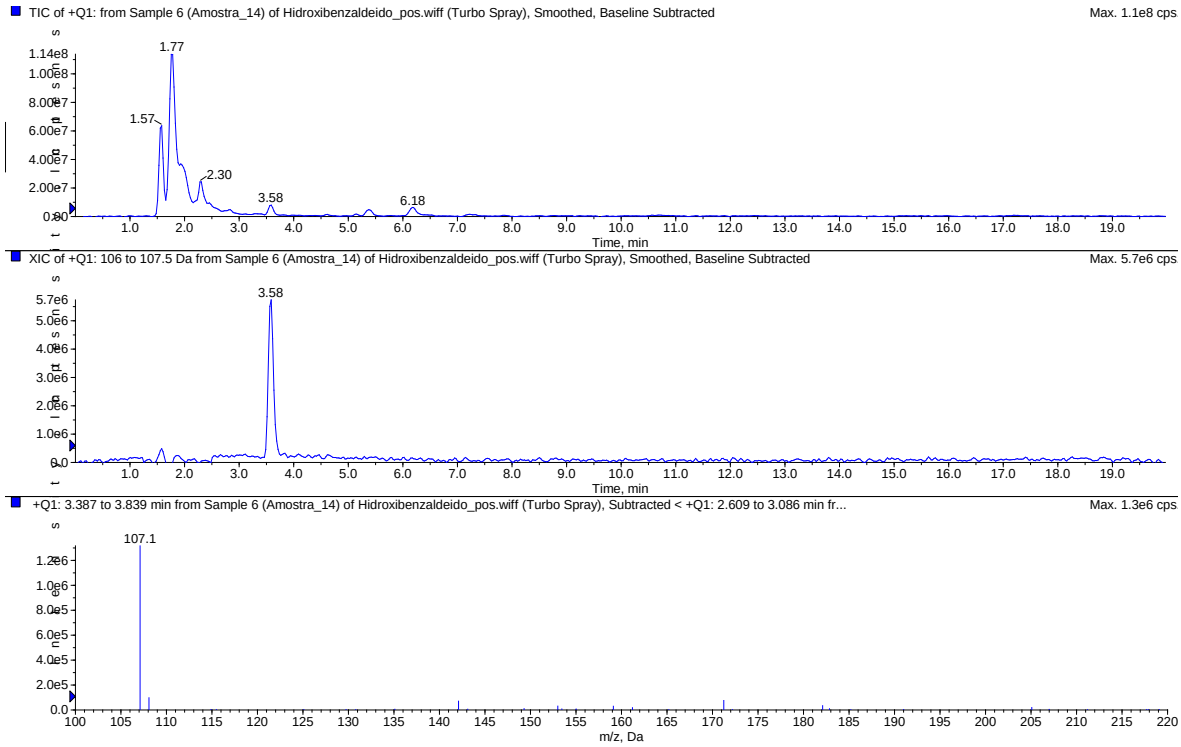


Figura 5.6 - TIC da amostra 14 (6 h de fermentação) no modo positivo, XIC de *m/z* 107,1, espectro de massas do pico em 3,5 min.

Dessa forma, a fermentação alcoólica de glicose pela *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, na presença do *p*-hidroxibenzaldeído, levou à formação tanto do produto oxidado quanto do produto reduzido. Por não possuirmos o padrão do álcool formado, não pudemos quantificá-lo. Mas pode-se supor que, pela baixa concentração do ácido *p*-hidroxibenzoico formado (0,028 g.L^{-1}, cerca de 25% do

rendimento teórico), o álcool correspondente seja o principal produto da bioconversão do *p*-hidroxibenzaldeído por esta levedura, nas condições deste estudo.

Correlacionando o perfil de bioconversão do *p*-hidroxibenzaldeído (Figura 5.8) com o perfil de crescimento da levedura, (Figura 5.7(a)), é possível notar que, ao mesmo tempo em que a levedura transformava esse composto fenólico (2 h iniciais), seu crescimento foi mais intenso, tendo sido maior para o meio com adição de *p*-hidroxibenzaldeído do que para o controle.

Na Figura 5.7 (c), notou-se que a formação do ácido acético foi mais intensa logo após 2 h, período no qual ocorreu a bioconversão do *p*-hidroxibenzaldeído (Figura 5.8). Segundo Liu (2011), as reações de redução dos aldeídos aromáticos pela *S. cerevisiae* ocorre pela ação catalítica de enzimas redutases, não especifícas.

De modo geral, a atuação de enzimas (redutases) ocorre com um cofator específico, NADH ou NADPH. Nas reações de redução dos aldeídos, porém, essas enzimas se acoplam aos dois cofatores citados, não tendo demonstrado forte preferência por um deles de forma específica. A ação dessas enzimas aumenta a concentração de acetaldeído no meio intracelular que, em presença do cofator oxidado NAD^+ (aceptor de elétrons), se transforma então em ácido acético (LIU et al., 2008 a; LIU; SAHA; SLININGER, 2008 b).

Pode-se concluir que o composto *p*-hidroxibenzaldeído, na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$, não é inibidor da fermentação alcoólica pela *S. cerevisiae* PE-2 e que esta é capaz de transformá-lo no meio fermentativo, formando tanto o produto oxidado quanto o reduzido, que provavelmente é formado em maior quantidade.

Neste trabalho, para a *S. cerevisiae* de panificação, concluiu-se que o *p*-hidroxibenzaldeído também não foi inibitório nas concentrações estudadas, 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$. Porém, para a concentração de 0,6 $g.L^{-1}$, também se detectou uma alteração do metabolismo da levedura, com um leve aumento do desvio de glicose para ácido acético.

Ando et al. (1986), em estudos de fermentação em meio sintético com a levedura *S. cerevisiae*, estudaram vários compostos, dentre os quais alguns são comuns a este trabalho (*p*-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído, ácido

p-hidroxibenzoico, ácido vanílico e ácido siríngico). A revisão mais detalhada das fermentações foi descrita no item 2.4.3.

Esses autores classificaram o *p*-hidroxibenzaldeído como um inibidor moderado (comparado aos outros estudados), pois ele afetou o fator de conversão de glicose em etanol que, no controle, foi de 53% do rendimento teórico e, no experimento com este composto, foi de 15%.

Delgenes, Moletta e Navarro (1996) estudaram a influência de 6 compostos derivados da degradação da lignina, dentre eles o *p*-hidroxibenzaldeído, a vanilina e o siringaldeído (comuns com este trabalho), na fermentação alcoólica de 4 micro-organismos. *C. shehatae* ATCC 22984 e *P. stipitis* NRRL Y 7124, espécies fermentadoras de hexoses e pentoses, em meio sintético suplementado com 20 $g.L^{-1}$ de xilose; e *S. cerevisiae* CBS 1200 *e Z. mobilis* ATCC 10988, espécies fermentadoras de hexoses, em meio sintético suplementado com 20 $g.L^{-1}$ de glicose. Para estudar a influência dos 6 compostos sobre a fermentação alcoólica desses micro-organismos, um controle foi realizado em cada caso. Para a fermentação de glicose por *S. cerevisiae*, a produção máxima de etanol no controle ocorreu após 24 h de fermentação. Nos meios suplementados com *p*-hidroxibenzaldeído, este foi adicionado nas concentrações de 0,5, 0,75 e 1,5 $g.L^{-1}$. Esses autores relataram o efeito inibitório sobre o crescimento celular e a produção de etanol. Em valores percentuais em relação ao controle, os resultados mostraram que o *p*-hidroxibenzaldeído foi inibitório em todas as concentrações, sendo que o efeito mais pronunciado se deu em relação ao crescimento microbiano e para a maior concentração do inibidor. Para 0,5 $g.L^{-1}$, os valores do crescimento microbiano e da produção de etanol, relativos ao controle (100%), foram de 75 e 97%, respectivamente. Para a concentração de 0,75 $g.L^{-1}$, foram de 47 e 63% e para a concentração de 1,0 $g.L^{-1}$, foram de 13 e 25%.

Esses resultados são muito diferentes dos obtidos neste trabalho. É importante ressaltar que, apesar dos micro-organismos serem da espécie *S. cerevisiae*, são de linhagens diferentes. Somado a isso, a concentração inicial de glicose naquele trabalho não foi a mesma, tendo sido muito menor do que a utilizada no presente estudo. Quanto à concentração do inóculo, os autores não foram claros, relatando que o inóculo correspondeu a 3% (v/v) do meio

fermentativo, que não nos informa muito, já que não foi relatada a concentração em massa, base seca, ou a contagem de células.

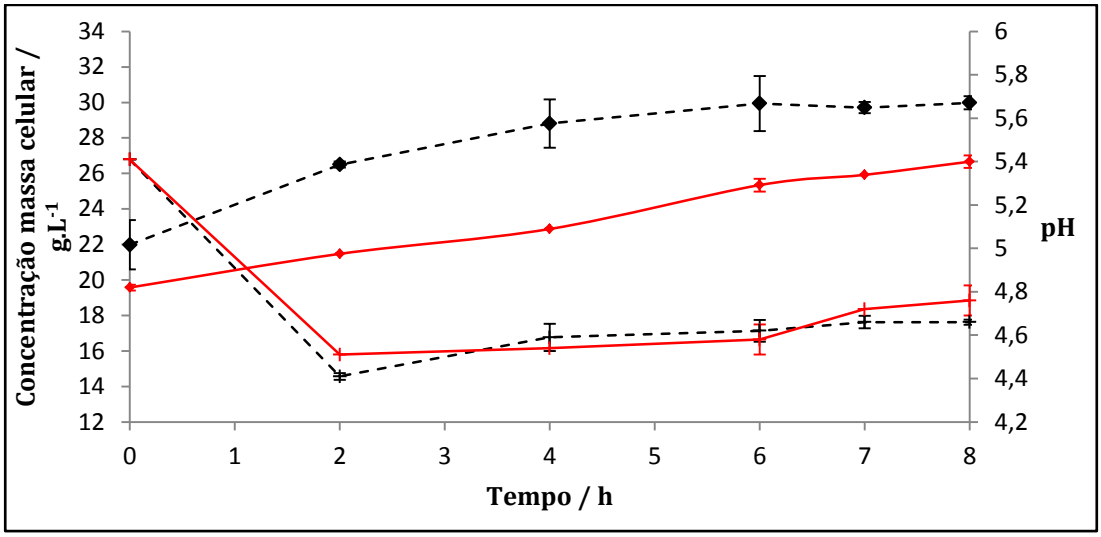
Em suma, os estudos têm mostrado que os resultados para a inibição são de difícil generalização, sendo fortemente dependentes do micro-organismo, das condições de fermentação, do tipo e da concentração do potencial inibidor.

Delgenes, Moletta e Navarro (1996) também estudaram a variação da concentração de *p*-hidroxibenzaldeído nos meios estudados. Eles relataram que, dentre os 4 micro-organismos estudados, apenas a *S. cerevisiae* CBS 1200 foi capaz de assimilar de forma significativa o *p*-hidroxibenzaldeído, em todas as concentrações estudadas. Porém, o tempo de conversão desse composto foi elevado, sendo que na concentração de 1,5 $g.L^{-1}$, ele foi completamente consumido após 30 h do início do processo. No presente estudo, a *S. cerevisiae* PE-2 realizou a conversão deste composto, na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$, em 2 h de fermentação. No trabalho realizado pelos autores, porém, não foi realizada a identificação dos produtos de bioconversão.

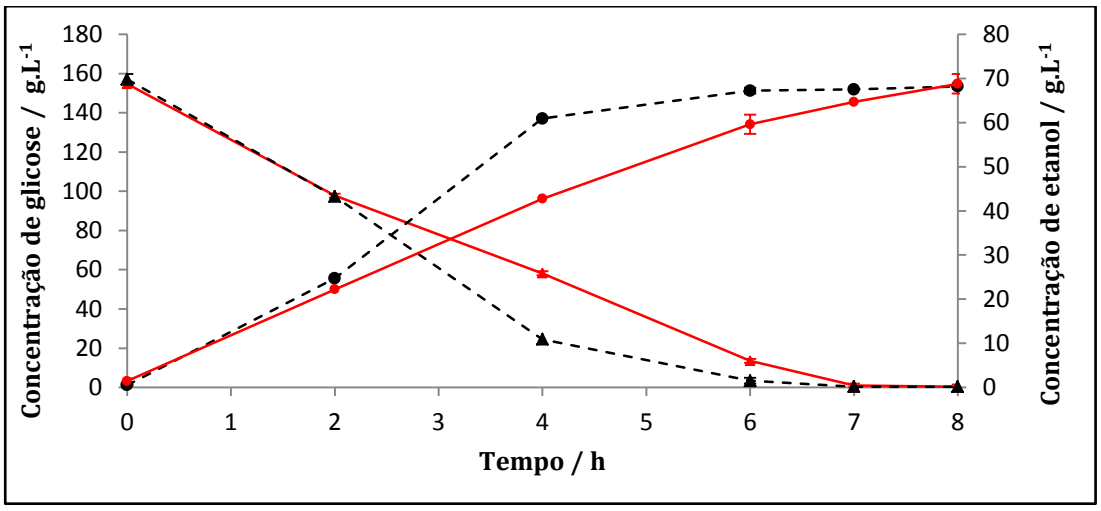
5.2.5. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de vanilina na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$

O perfil da fermentação alcoólica pela *S. cerevisiae* PE-2 é mostrada na Figura 5.7.

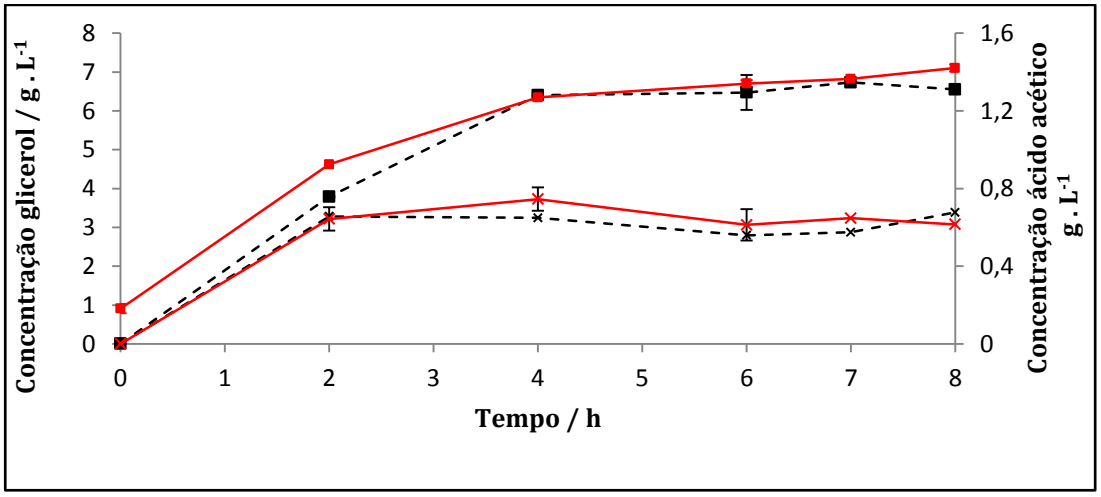
Na Figura 5.7 (a), o aumento de biomassa para o teste controle ocorreu até 6 h de fermentação, mantendo-se constante a partir desse momento. Para o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de vanilina, o crescimento foi praticamente constante durante todo o processo. Devida à diferença na concentração inicial de massa celular, as curvas, apesar de apresentarem um comportamento semelhante, estão distanciadas em termos de valores absolutos de massa celular.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.7 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência (tracejado) e presença de 0,1 g.L^{-1} de **vanilina**; **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (**+**); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (**x**).

Ainda na Figura 5.7 (a), a análise da variação do pH mostra novamente que, após 2 h de fermentação, o pH decresce acentuadamente, não mostrando

variações importantes a partir desse momento. Para o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de vanilina, entre 4 h e 6 h o pH ficou um pouco abaixo do pH do controle, elevando-se em relação a este após 7 h de processo.

Na Figura 5.7 (b), porém, foi significativa a redução da inclinação das curvas de consumo de glicose e de produção de etanol no experimento com 0,1 $g.L^{-1}$ de vanilina, no período de 2 a 6 h de fermentação. Esse comportamento irá refletir na produtividade volumétrica de etanol, que é um parâmetro que depende do tempo.

Na Figura 5.7 (c) notou-se que a produção de glicerol foi um pouco maior nas duas primeiras horas de fermentação, comparada ao controle. Quanto à formação de ácido acético, os testes foram praticamente iguais até 2 h de fermentação. A partir de 2 h, notou-se uma pequena elevação na formação de ácido acético pela *S. cerevisiae* PE-2 na presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de vanilina.

Em seguida à análise do perfil fermentativo, calcularam-se os parâmetros de avaliação da fermentação (Tabela 5.16).

Os parâmetros foram calculados para os tempos nos quais ocorreu a produção máxima de etanol, sendo após 6 h para o controle e após 8 h, no caso do teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de vanilina.

Nenhum dos rendimentos avaliados foi afetado pela presença da vanilina no meio fermentativo, considerando-se os desvios. Porém, observou-se que a produtividade volumétrica de etanol foi bastante afetada, com diminuição de 23 ± 5 % relativamente ao controle. Em outras palavras, a presença da vanilina, apesar de não inibir o crescimento microbiano e a formação de etanol, tornou-a mais lenta.

A análise dos cromatogramas de íons totais, seguida do cromatograma de íon extraído, para as amostras do teste com a vanilina, mostrou que, já na amostra do tempo 0 h, não foi detectada a presença de vanilina. Porém, já no tempo inicial de amostragem, detectaram-se os seus produtos de oxirredução.

Pelo fato de a vanilina ter sido rapidamente transformada pela levedura, pode-se dizer que a fermentação não ocorreu em presença da vanilina, mas sim de seus produtos de oxirredução. O lento crescimento nas 2 primeiras horas pode ser relacionado a essa transformação da vanilina.

Tabela 5.16 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de vanilina. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol; aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados para a fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2, após 6 h para o controle e após 8 h para o teste com de 0,1 $g.L^{-1}$ de vanilina.

Parâmetros de fermentação	**Concentração vanilina ($g . L^{-1}$)**	
	0,0	**0,1**
Glicose residual (g)	3 ± 3	0,4 ± 7
Glicose residual (%)	2 ± 2%	0,3 ± 5%
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	67 ± 3	69 ± 2
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	11,1 ± 0,5	8,6 ± 0,3
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,05 ± 0,02	0,046 ± 0,004
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,042 ± 0,003	0,046 ± 0,002
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,0036 ± 0,0005	0,0040 ± 0,0003
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,43 ± 0,02	0,44 ± 0,03
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	85 ± 2	86 ± 3

A varredura inicial no espectrômetro de massas ocorreu no modo negativo de ionização e detectou a presença do ácido vanílico, a partir do pico de *m/z* 167,2 e tempo de retenção 7,5 min, conforme o espectro de massas e fragmentação para este composto (Apêndice C.2). A Figura 5.8 mostra a variação da concentração do ácido vanílico durante a fermentação.

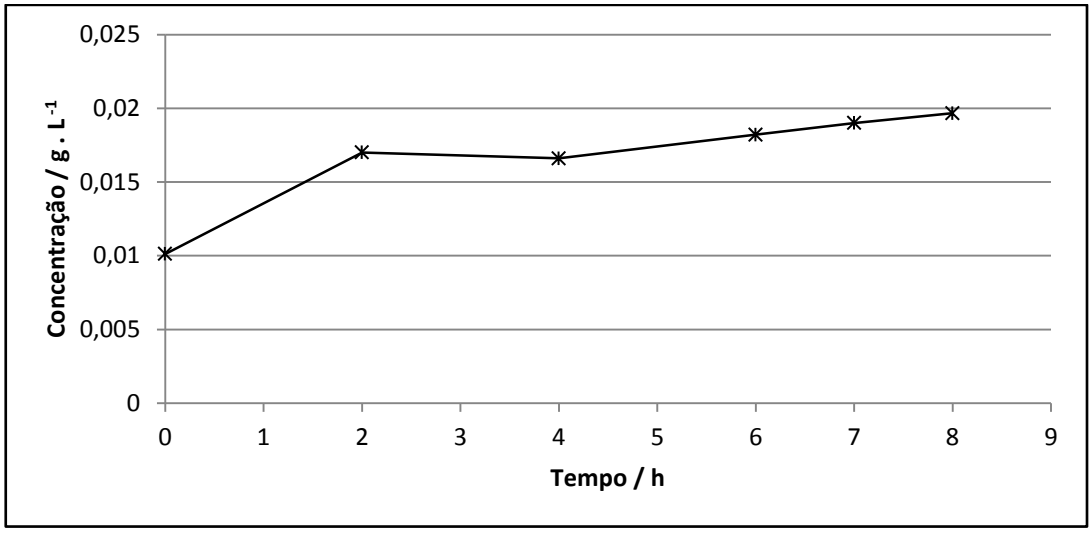


Figura 5.8 – Aumento da concentração de ácido vanílico (x) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de vanilina.

O aumento da concentração desse ácido foi rápido nas duas horas iniciais, mantendo-se relativamente constante de 2 a 6 h de fermentação e aumentando novamente até 8 h, último tempo de amostragem. Nesse período de 4 horas, pode-se correlacionar a presença do ácido vanílico à baixa taxa de consumo de glicose e formação de etanol, comparadas ao controle, conforme discutido para a na Figura 5.7 (b). A presença do ácido vanílico, mesmo em baixas concentrações, dificultou o consumo de glicose e formação de etanol pela levedura *S. cerevisiae* PE-2.

A quantidade máxima de ácido vanílico formada, cerca de 0,020 $g.L^{-1}$, corresponde a um consumo de 0,018 $g.L^{-1}$ de vanilina, ou seja, 18% da vanilina inicial. A formação do produto de redução foi então investigada. Segundo De Wulf et al. (1986), este seria o principal produto de bioconversão da vanilina. A discussão feita no item 5.2.4 para a ação das redutases também justifica a busca pelo produto de redução (LIU et al*.,* 2008 a; LIU; SAHA; SLININGER, 2008 b; LIU, 2011).

Realizaram-se análises no modo positivo de ionização, em busca do produto de redução da vanilina, o álcool vanilíco, na forma de seu íon $[M+H]^+$. Observou-se um novo pico em 4,3 min, com *m/z* 137,1. A detecção do íon *m/z* 137,1, ao invés de *m/z* 155,1, ocorreu devido à eliminação de água e formação do

carbocátion benzílico, altamente estável (conforme discutido para a identificação ao álcool *p*-hidroxibenzílico).

A Figura 5.9 mostra o cromatograma de íons (TIC) no modo positivo, o espectro de íon extraído (XIC) para o álcool vanilíco, com varredura entre 136 e 137,5 e o seu espectro de massas, para o tempo de retenção de 4,3 min. Os espectros de íons fragmento da vanilina e de seus produtos de oxirredução são mostrados no Apêndice C.2.

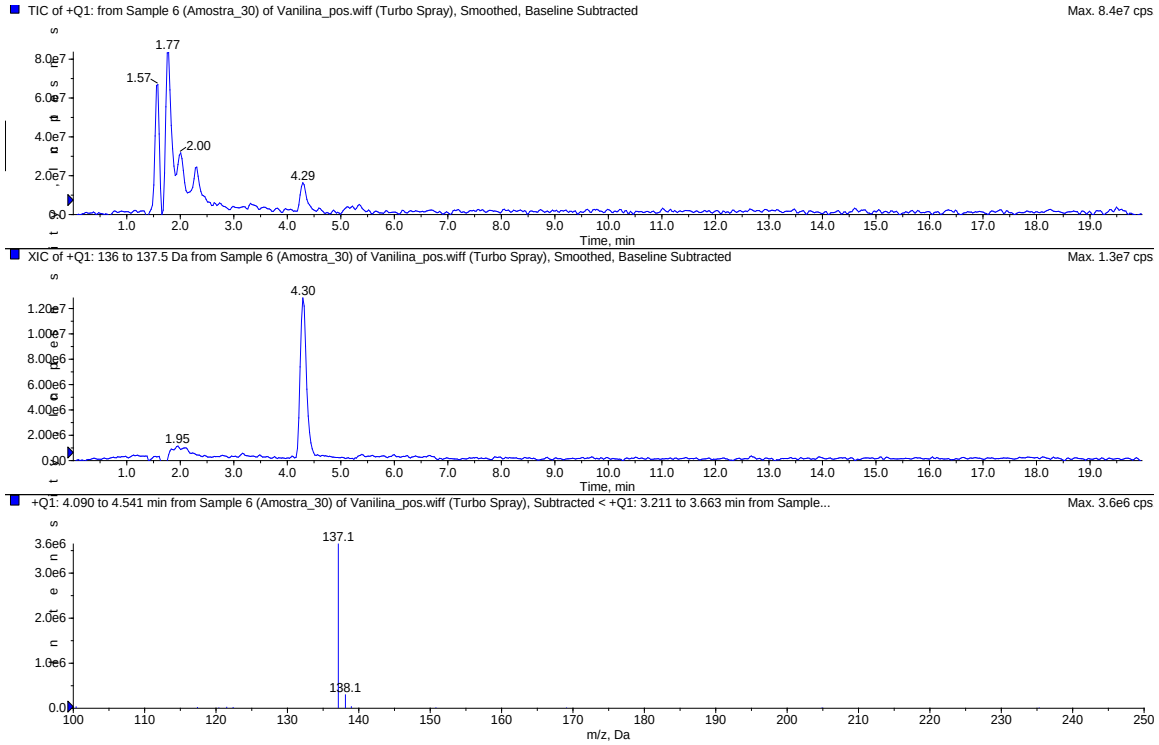


Figura 5.9 - TIC da amostra 30 (6 h de fermentação) no modo positivo, XIC de *m/z* 137, espectro de massas da banda em 4,3 min.

Da mesma forma do ocorrido para o *p*-hidroxibenzaldeído, a fermentação alcoólica de glicose pela *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, na presença da vanilina, levou à formação tanto do produto oxidado quanto do produto reduzido. Por não possuirmos o padrão do álcool formado, não pudemos quantificá-lo. É possível, porém, que o álcool vanilíco seja o produto formado em maior quantidade, pois o ácido vanílico correspondeu a 18% do rendimento teórico a partir da vanilina adicionada.

A vanilina não inibiu nem o crescimento da levedura e nem a produção de etanol, mas diminuiu a produtividade volumétrica de etanol, o que tornou o processo global mais lento.

Para a levedura *S. cerevisiae* de panificação estudada na primeira parte deste trabalho, a vanilina provocou um efeito semelhante quanto à diminuição da eficiência no consumo de glicose. A vanilina diminuiu a produtividade volumétrica de etanol nas duas concentrações estudadas (0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$). Porém, ela também afetou o fator de conversão de glicose em células quando presente na concentração mais alta e o desvio de glicose para ácido acético para ambas as concentrações.

Delgenes, Moletta e Navarro (1996), em trabalho já comentado na discussão dos resultados com o *p*-hidroxibenzaldeído (item 5.2.4) estudaram, também, a ação da vanilina na fermentação alcoólica das 4 espécies de leveduras. Para a *S. cerevisiae* CBS 1200, eles relataram a inibição crescimento microbiano e da produção de etanol até para a menor concentração utilizada. Ao meio fermentativo suplementado com 20,0 $g.L^{-1}$ de glicose, os autores adicionaram vanilina a 0,5, 1,0 e 2,0 $g.L^{-1}$. O crescimento microbiano e a produção de etanol, em valores percentuais comparados ao controle (100%) foram, para as três concentrações, respectivamente, (49% e 70%), (14% e 17%) e para a maior concentração (9% e 11%). Esta levedura foi capaz de converter a vanilina, o que ocorreu a uma taxa reduzida até 12 h de fermentação, aumentando um pouco e, a partir de 24 h, a bioconversão da vanilina ocorreu rapidamente, tendo sido completamente transformada após 32 h do processo. Os autores não fizeram a identificação do produto de bioconversão da vanilina, mas citaram o trabalho de De Wulf et al. (1986), que mostra que o álcool vanílico é o principal produto de bioconversão da vanilina pela *S. cerevisiae*.

Ando et al. (1986) também estudaram a ação da vanilina na fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*. A vanilina foi considerada um inibidor moderado, com ação inibitória mais baixa, inclusive, que a do *p*-hidroxibenzaldeído. Esse dado é discordante do que encontramos no presente trabalho, no qual a vanilina foi mais inibitória que o *p*-hidroxibenzaldeído, alterando principalmente a produtividade volumétrica de etanol. Ando et al. (1986) mediram a inibição em relação ao fator de conversão de glicose em etanol, que foi de 40% em relação ao rendimento teórico (o controle apresentado pelos autores obteve um rendimento de 53% do rendimento teórico). Eles também relataram que a fase *lag* em presença de vanilina foi de 22 h, enquanto que no controle foi de 18 h.

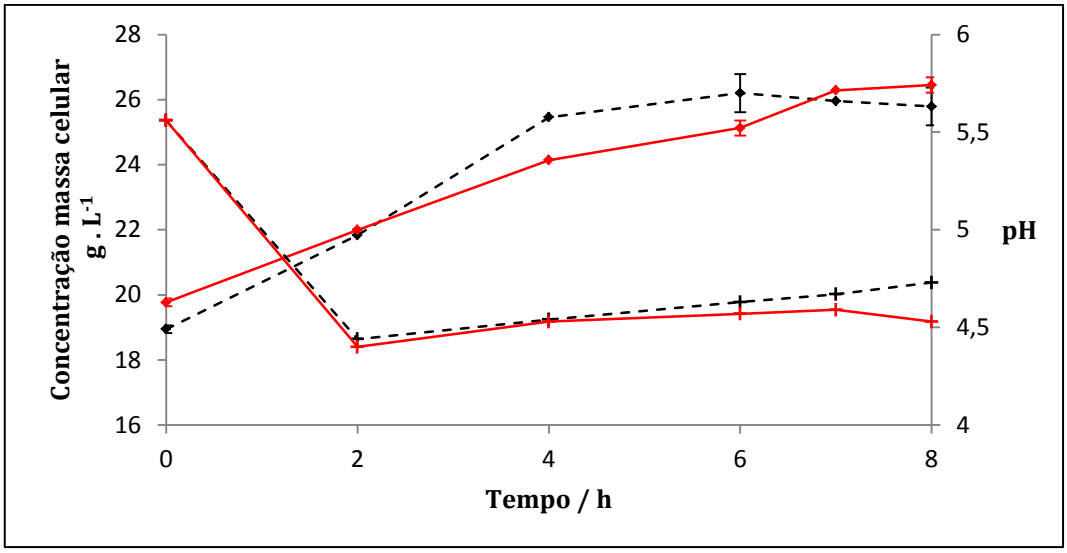
Larsson et al. (2000) utilizaram 20 compostos aromáticos (dentre eles a vanilina e os ácido cumárico e ferúlico, também estudados no presente trabalho) em fermentações com 20,0 $g.L^{-1}$ de glicose e inóculo de 0,16 $g.L^{-1}$, que foram adicionados ao meio fermentativo nas concentrações de 0,02, 0,2 e 1,0 $g.L^{-1}$. A vanilina, nas duas concentrações mais baixas, não afetou os parâmetros fermentativos avaliados. Porém, na concentração de 1,0 $g.L^{-1}$, observou-se uma pequena queda na produtividade volumétrica de etanol, mas ainda dentro do desvio-padrão da fermentação controle. O fator de conversão de glicose em células, porém, foi afetado, passando de 0,076 ± 0,003 $g.g^{-1}$ de glicose (controle) para 0,054 $g.g^{-1}$ de glicose.

Em nosso trabalho, a presença da vanilina na mesma concentração, na fermentação com a levedura de panificação, ao invés de diminuir, aumentou o rendimento da massa celular em 25 ± 14 %. A produtividade de etanol também foi afetada e na mesma proporção para as concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$, porém com uma redução pequena, assim como observado por Larsson et al. (2000). Para a levedura *S. cerevisiae* PE-2, a fermentação com 0,1 $g.L^{-1}$ de vanilina teve afetada a produtividade volumétrica em maior extensão, devido à dificuldade para o consumo da glicose. A levedura de panificação, utilizada por esses autores, foi capaz de converter a vanilina a álcool vanílico, assim como mostrado no presente trabalho. Os autores, porém, não relataram a formação do ácido vanílico.

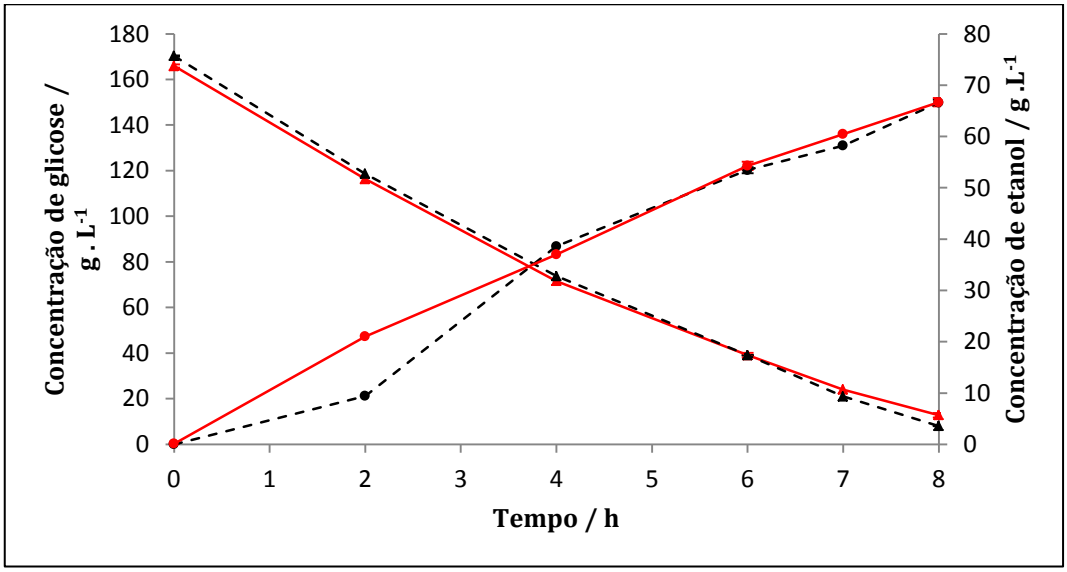
5.2.6. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de siringaldeído na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$

O perfil da fermentação alcoólica pela *S. cerevisiae* PE-2, na ausência e na presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de siringaldeído é mostrado na Figura 5.10.

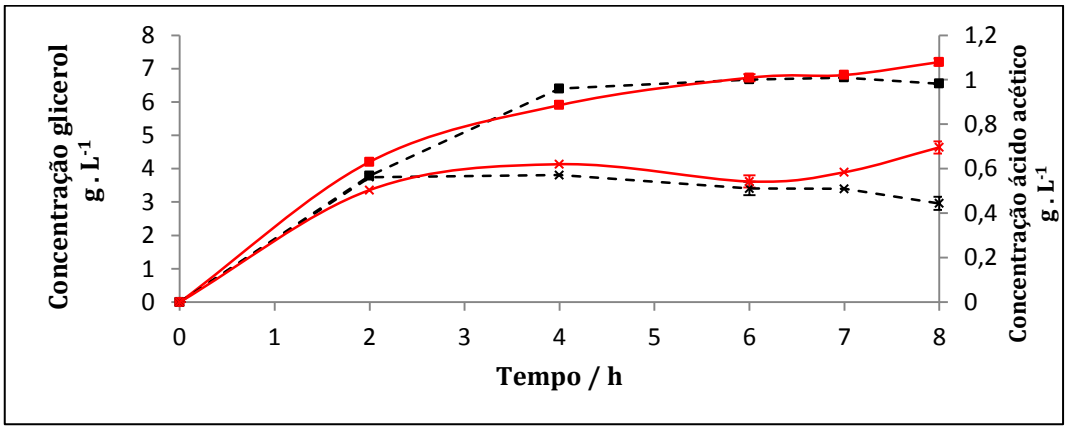
Na Figura 5.10 (a), o crescimento microbiano foi mais intenso no controle, tornando-se constante a partir de 6 h do início do processo. Para o experimento com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de siringaldeído, esse crescimento é mais lento até 4 h, tornando-se um pouco mais intenso de 4 a 6 h, e tem uma elevação abrupta de 6 a 7 h, quando então torna-se constante.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.10 – Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência (tracejado) e presença de 0,1 g.L^{-1} de **siringaldeído**. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (**+**); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (**x**).

Ainda na Figura 5.10 (a), avaliou-se o comportamento do pH. A variação do pH foi bastante semelhante entre o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de siringaldeído e seu controle. Uma pequena diferença ocorreu após 6 h de fermentação, quando o pH do controle aumentou um pouco e o do experimento com o composto fenólico se manteve constante. O valor do pH para este teste foi ligeiramente menor durante todo o experimento.

A produção de etanol e o consumo de glicose, Figura 5.10 (b), obtiveram um perfil praticamente idêntico para os dois testes, a não ser pela concentração de etanol no controle no tempo de 2 h, que foi baixa, provavelmente devido à ao maior crescimento microbiano no mesmo período.

Quanto aos subprodutos glicerol e ácido acético, Figura 5.10 (c), notou-se que não houve grande diferença no comportamento entre os dois testes. Porém, ocorreu um pequeno aumento na produção, tanto de glicerol quanto de ácido acético, no teste com o siringaldeído, entre 7 e 8 h de fermentação, logo após o aumento abrupto de biomassa, entre 6 e 7 h, conforme Figura 5.10 (a).

A partir dos resultados experimentais, os parâmetros para avaliar as fermentações foram calculados para os testes controle e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de siringaldeído. A produção máxima de etanol ocorreu para o tempo de 8 h de fermentação e, portanto, os valores calculados referem-se a esse tempo de ensaio.

A Tabela 5.17 mostra os valores com seus respectivos desvios padrão.

A glicose residual percentual foi maior no teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de siringaldeído. Ao se analisarem as curvas da Figura 5.13 (a) e (b), notou-se que o crescimento microbiano praticamente cessou no tempo de 7 h. No entanto, a produção de etanol continuou aumentando após 7 h, indicando que a fermentação se prolongou um pouco mais do que a última coleta de amostra.

A concentração e a produtividade volumétrica de etanol não se alteraram.

A adição de siringaldeído ao meio fermentativo aumentou o desvio de glicose para ácido acético em 67 ± 12 %. Como comentado anteriormente, item 5.1.2.4, do ponto de vista industrial, esse desvio da massa do substrato torna-se significativo devido à elevada escala do processo. Conforme já discutido para o *p*-hidroxibenzaldeído e para a vanilina, existe uma correlação entre a formação de ácido acético e a bioconversão pela levedura, do aldeído ao álcool correspondente.

Tabela 5.17 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de siringaldeído. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol e aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 8 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2.

Parâmetros de fermentação	**Concentração siringaldeído ($g . L^{-1}$)**	
	0,0	**0,1**
Glicose residual (g)	8,01 ± 0,04	12,8 ± 1
Glicose residual (%)	4,70 ± 0,03%	8 ± 1%
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	66,6 ± 0,6	66,7 ± 0,8
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	8,32 ± 0,07	8,3 ± 0,1
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,042 ± 0,004	0,044 ± 0,002
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,0459 ± 0,0002	0,0470 ± 0,0008
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,0027 ± 0,0002	0,0045 ± 0,0002
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g.\ g^{-1}_{glicose}$)	0,410 ± 0,004	0,44± 0,01
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	80,3 ± 0,4	85 ± 1

O pequeno aumento do desvio de glicose para glicerol está dentro da margem de erro experimental.

O fator de conversão de glicose em etanol aumentou em 7 ± 3 %. Apesar de pequeno, é um indício que de o siringaldeído não é inibidor da produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* PE-2.

Após a avaliação dos parâmetros de fermentação, acompanhou-se a variação da concentração do siringaldeído no meio fermentativo a partir dos dados do espectrômetro de massas.

O siringaldeído foi detectado apenas no tempo inicial, nos modos negativo e positivo de ionização. Ele apresentou *m/z* 181,0 no modo negativo e *m/z* 183,2 no modo positivo, com tempo de retenção de 14,1 min. A quantificação foi realizada no modo positivo (conforme curva de calibração, Apêndice A). A concentração inicial foi calculada em 0,07 $g.L^{-1}$, menor do que a concentração

adicionada (0,1 g.L^{-1}), indicando uma rápida biotransformação desse composto pela *S. cerevisiae* PE-2.

Devido ao elevado consumo do siringaldeído, a investigação prosseguiu à procura dos seus produtos de oxirredução, ácido siríngico e álcool siringílico.

O ácido siríngico foi identificado no modo negativo de ionização, a partir do pico de *m/z* 196,9 e tempo de retenção 8,2 min, conforme o espectro de massas e fragmentação para este composto (Apêndice C.3). Porém, ele se formou em pequeníssima quantidade, com valor máximo medido, no tempo de 6 h, igual a 0,0039 g.L^{-1}. Isso corresponde a 2 x 10^{-5} mol. Assim, houve um consumo de 0,0036 g.L^{-1} de siringaldeído, uma conversão de apenas 3,6%.

A Figura 5.11 mostra a concentração do ácido siríngico em função do tempo.

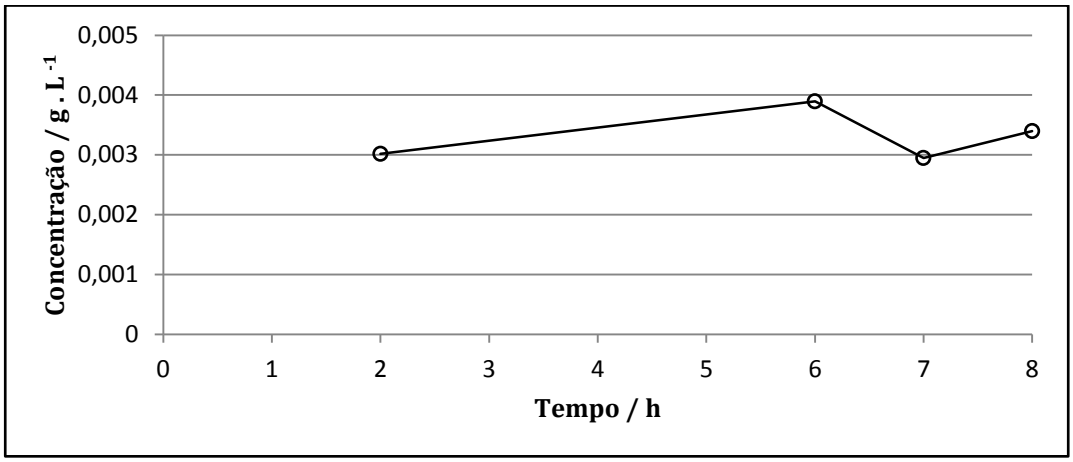


Figura 5.11 - Concentração de ácido siríngico formado (○) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 g.L^{-1} de siringaldeído.

Já no modo positivo de ionização, foi possível identificar o álcool siringílico pelo pico do íon *m/z* 167,1 e tempo de retenção de 4,8 min. A detecção do íon *m/z* 167,1 corresponde, assim como para os alcoóis *p*-hidroxibenzílico e vanílico, ao correspondente carbocátion benzílico, que é altamente estável, formado devido à eliminação de água do carbono benzílico.

A Figura 5.12 mostra o cromatograma de íons totais (TIC) no modo positivo, o espectro de íon extraído (XIC) para o álcool siringílico, com varredura entre 166 e 167,5 e o seu espectro de massas, da banda de 4,8 min. O espectro de íons fragmento do siringaldeído e de seus produtos de oxirredução podem ser vistos no Apêndice C.3.

Como o produto de oxidação foi formado em pequena quantidade, concluiu-se que o álcool siringílico, provavelmente, seja o principal produto de biotransformação do siringaldeído pela levedura *S. cerevisiae* PE-2.

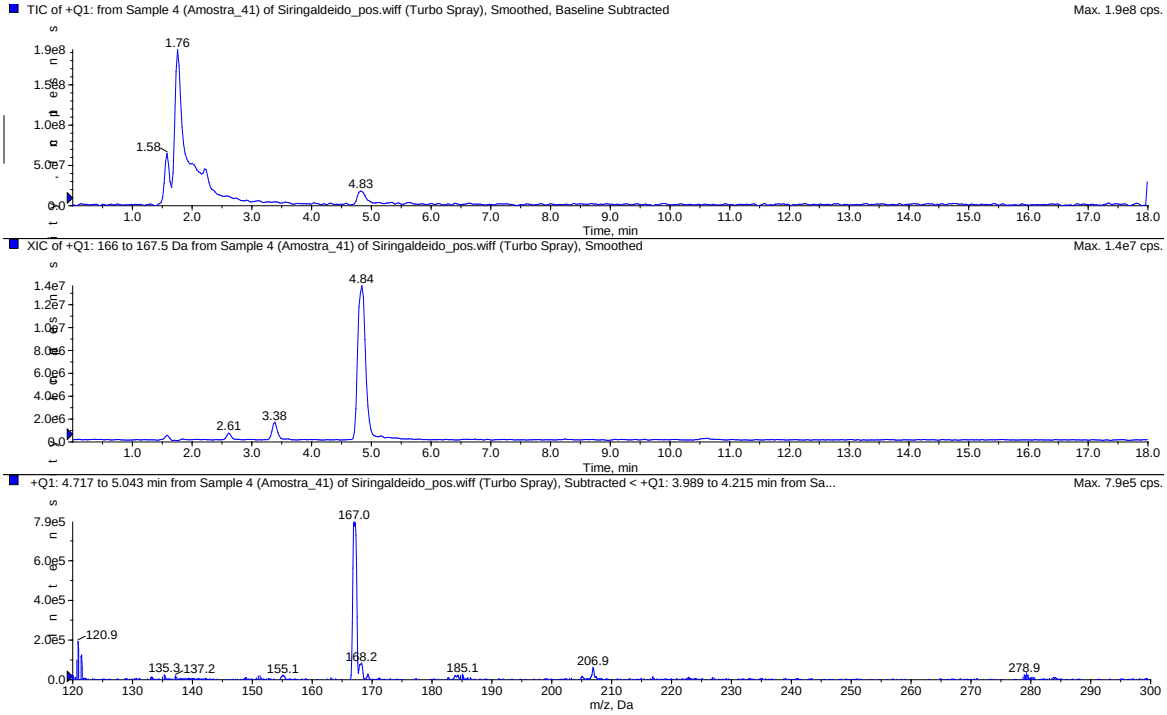


Figura 5.12 - TIC da amostra 41 (2 h de fermentação) no modo positivo, XIC de *m/z* 167, espectro de massas da banda em 4,8 min.

Além disso, a literatura mostra, conforme já discutido para os dois primeiros aldeídos deste trabalho, que os casos registrados de bioconversão dos aldeídos pela *S. cerevisiae* resultaram no produto de redução (De WULF et al., 1986; LIU et al., 2008 a; LIU; SAHA; SLININGER, 2008 b; LIU, 2011; LARSSON et al., 2000).

Para este composto não havia um padrão para quantificação em unidade de concentração ($g.L^{-1}$). Assim, a Figura 5.16 mostra a área do cromatograma de íons totais em função do tempo.

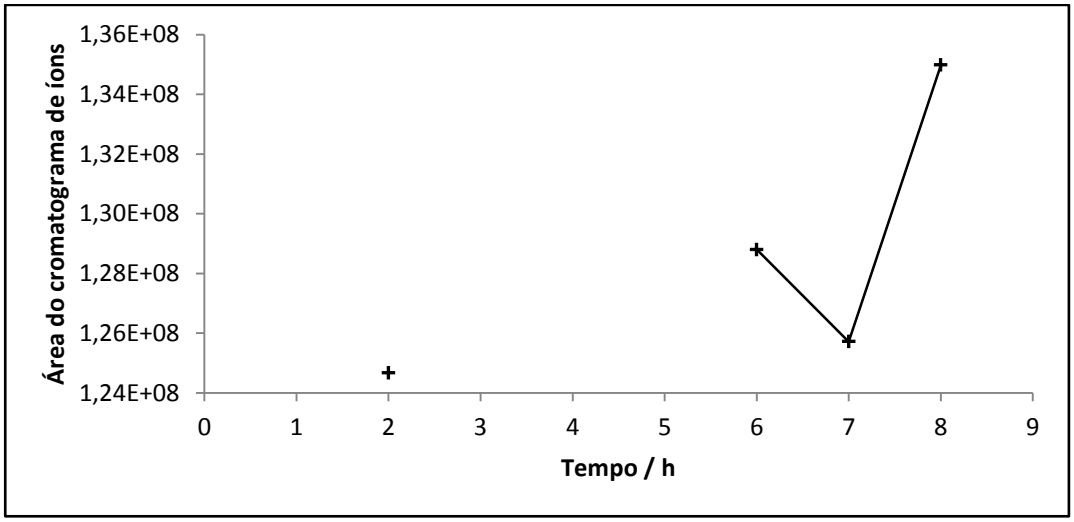


Figura 5.13 - Área do cromatograma em função do tempo, referente ao álcool siringílico (+) formado durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de siringaldeído.

Apesar de não ter sido detectado na amostra correspondente ao tempo de 4 h, percebeu-se que houve um aumento da concentração do álcool siringílico, sendo este aumento bem proeminente entre 7 e 8 h de fermentação.

Conforme discutido anteriormente, redutases não específicas catalisam as reações de redução dos aldeídos presentes no meio fermentativo, aumentando a concentração de acetaldeído, que forma então ácido acético (LIU et al*.,* 2008 a; LIU; SAHA; SLININGER, 2008 b; LIU, 2011). Os resultados para a fermentação na presença do siringaldeído, assim como foram os do *p*-hidroxibenzaldeído e da vanilina, confirmam esses dados.

Neste trabalho, comparando os resultados pela levedura *S. cerevisiae* de panificação com a cepa PE-2, a presença do siringaldeído afetou mais a primeira. Há que se considerar, também, que as concentrações utilizadas foram bem maiores. Assim, o siringaldeído foi um inibidor moderado para a levedura de panificação, diminuindo a produtividade volumétrica e deixando uma glicose residual relativamente elevada. Para a cepa PE-2, o siringaldeído afetou apenas o desvio de glicose para ácido acético, efeito esse comum ao causado à levedura de panificação. O aumento do desvio de glicose para ácido acético já foi extensamente discutido neste trabalho.

Ando et al. (1986) estudaram a ação do siringaldeído e o consideraram como um inibidor moderado, menos inibitório do que a vanilina, por exemplo. Esse resultado, ao contrário do que ocorreu para o *p*-hidroxibenzaldeído, é concordante com os nossos resultados. Em relação ao controle, que obteve fator

de conversão de glicose em etanol equivalente a 53% do rendimento teórico, o meio com siringaldeído obteve 45%. A fase *lag* durou 22 h, porém o controle utilizado teve uma fase *lag* de 18 h.

Delgenes, Moletta e Navarro (1996) estudaram a influência do siringaldeído sobre a fermentação alcoólica de *S. cerevisiae* CBS 1200, nas concentrações de 0,2, 0,75 e 1,0 $g.L^{-1}$. Os resultados foram publicados em valores percentuais relativos ao controle, para o crescimento microbiano e para a produção de etanol. Nesta ordem, para as três concentrações do composto, os resultados foram, (100% e 74%), (39% e 46%) e (19% e 33%). A levedura foi capaz de assimilar o siringaldeído, mas os produtos da bioconversão não foram objeto de estudo daquele trabalho.

A inibição relatada por Delgenes, Moletta e Navarro (1996) é muito alta comparada aos nossos resultados e comparadas aos resultados por Ando et al. (1986). Essa inibição ocorreu para duas cepas (*C. shehatae* ATCC 22984 e *P. stipitis* NRRL Y 7124) fermentadoras de xilose também estudadas por eles, mas foi menos acentuada do que para *Z. mobilis* ATCC 10988.

Não há uma variedade muito grande de trabalhos que estudem o efeito dos derivados da lignina sobre a *S. cerevisiae*. Os estudos mais abundantes focam nos hidrolisados hemicelulósicos e, portanto, nos organismos fermentadores de xilose.

5.2.7. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de ácido *p*-hidroxibenzoico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$

O perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2 é mostrado na Figura 5.14.

A Figura 5.14 (a) mostra que a presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido *p*-hidroxibenzoico favoreceu o crescimento microbiano nas quatro primeiras horas de fermentação.

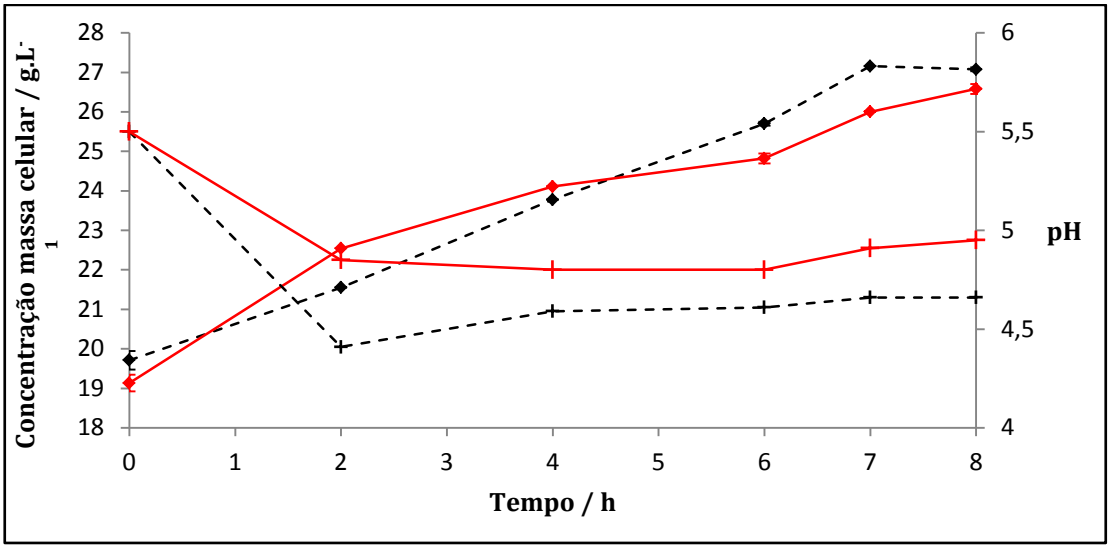
Quanto ao pH, ele decresceu para ambos os testes após 2 h de fermentação. Para o controle, o pH se elevou um pouco após 4 h. Para o teste

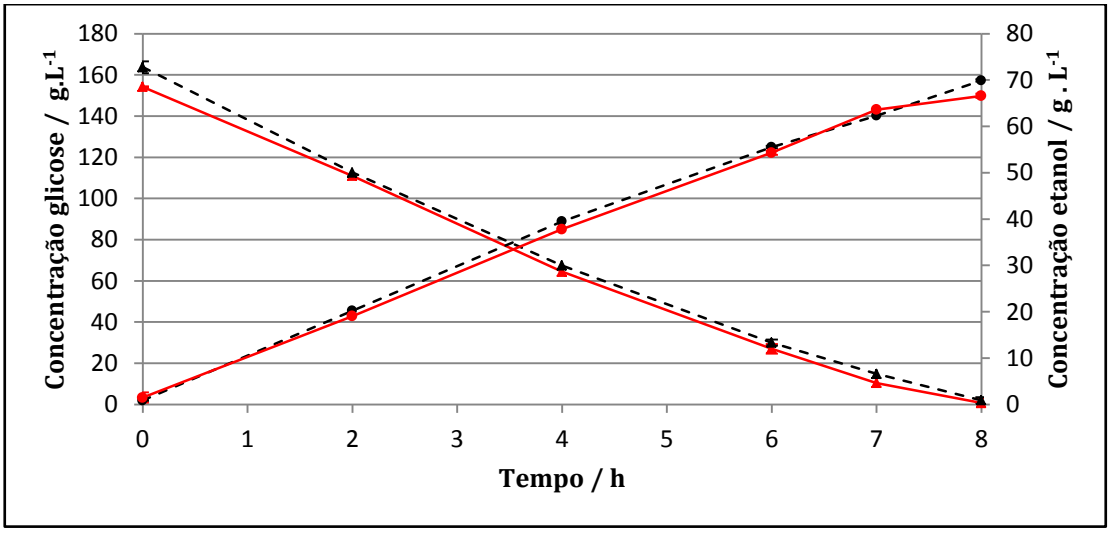
com o ácido *p*-hidroxibenzoico, observou-se um comportamento similar ao que foi observado para a fermentação na presença do *p*-hidroxibenzaldeído. Apesar de decrescer em relação ao pH inicial, o pH desses testes, após 2 h, teve um valor maior que no teste controle. Esse valor se manteve praticamente constante até o final da fermentação.

Na Figura 5.14 (b), notou-se que não há diferenças marcantes para o perfil de consumo de glicose e de formação de etanol para os dois testes.

Na Figura 5.14 (c), o perfil da formação de glicerol, assim como observado para a de consumo de glicose e de formação de etanol, não apresentou diferença entre os dois testes.

Já para o perfil de formação do ácido acético, cabe ressaltar que o ácido acético não foi detectado após 2 h de fermentação para o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido *p*-hidroxibenzoico. Isso também ocorreu para a fermentação na presença do *p*-hidroxibenzaldeído e os valores mais elevados de pH, para os testes com esses dois compostos em relação ao controle, podem ser atribuídos à formação tardia do acido acético na fermentação.





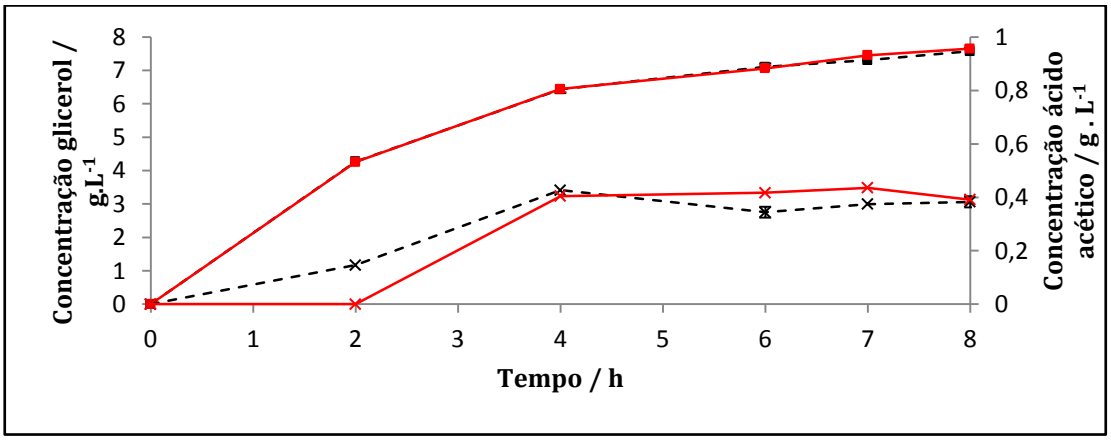


Figura 5.14 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência (tracejado) e presença de 0,1 g.L^{-1} de **ácido *p*-hidroxibenzoico**. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (+); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (x).

A Tabela 5.18 mostra os resultados experimentais dos parâmetros calculados para avaliar as fermentações para os testes controle e com adição de ácido *p*-hidroxibenzoico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$, nos quais a produção máxima de etanol ocorreu para o tempo de 8 h de fermentação.

A levedura *S. cerevisiae* PE-2 consumiu toda a glicose em 8 h de fermentação, independentemente da presença ou ausência do ácido *p*-hidroxibenzoico.

Tabela 5.18 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido *p*-hidroxibenzoico. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol e aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 8 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de ácido *p*-hidroxibenzoico ($g . L^{-1}$)**	
	0,0	**0,1**
Glicose residual (g)	2 ± 2	0,7 ± 2
Glicose residual (%)	1 ± 1%	0,5 ± 2%
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	69,9 ± 0,2	67 ± 1
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	8,74 ± 0,06	8,3 ± 0,2
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,046 ± 0,002	0,049 ± 0,002
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,047 ± 0,001	0,050 ± 0,001
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,0024 ± 0,0001	0,00255 ± 0,00008
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,43 ± 0,01	0,43 ± 0,01
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	83,6 ± 0,9	85 ± 1

Após 8 h do processo, a concentração de etanol e a produtividade volumétrica de etanol praticamente não se alteraram, observando-se um pequeno decréscimo em relação ao controle, de 4 ± 2 %. A glicose foi completamente consumida nos dois testes. Porém, sua concentração inicial foi um pouco maior no teste controle, com uma diferença de 9,5 $g.L^{-1}$, que resulta em uma diferença, a partir do fator de conversão de glicose em etanol que foi calculado, de (0,43 x 9,5) = 4,1 $g.L^{-1}$ na concentração de etanol. A diferença apresentada na

Tabela 5.18 está dentro do esperado, considerando-se os desvios associados às medidas.

Nenhum dos parâmetros calculados sofreu diferença pela adição de 0,1 g.L^{-1} de ácido *p*-hidroxibenzoico, considerando-se o erro dado pelo desvio padrão das amostras.

Em seguida à análise dos parâmetros de fermentação, avaliou-se como a concentração do ácido *p*-hidroxibenzoico variou durante o processo e se a levedura em estudo provocou alguma alteração nessa substância.

A Figura 5.15 mostra que a variação da concentração do ácido *p*-hidroxibenzoico durante a fermentação alcoólica foi mínima.

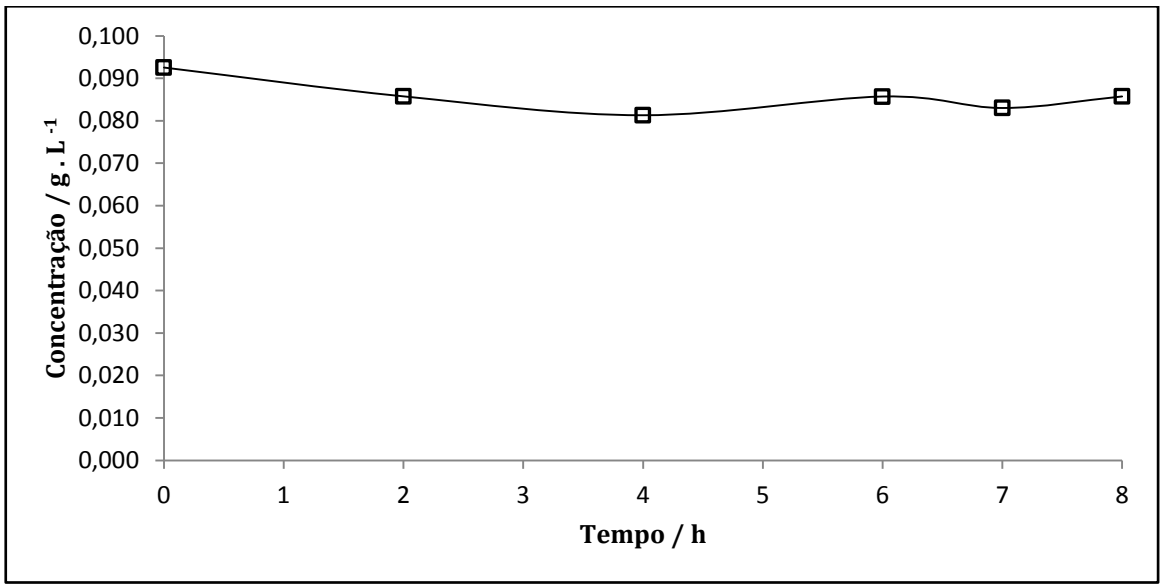


Figura 5.15 - Concentração de ácido *p*-hidroxibenzoico (□) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 g.L^{-1} de ácido *p*-hidroxibenzoico.

Notou-se que esta concentração manteve-se praticamente constante durante todo o experimento. A diferença entre o maior (0,0925 g.L^{-1}; 0 h) e o menor (0,0813 g.L^{-1}; 4 h) valor detectado foi de 12% e entre o valor inicial e o valor final (0,0857 g.L^{-1}; 8 h) foi de 7%.

Somado a isso, não foram identificados, nos cromatogramas, os íons correspondentes aos possíveis produtos de redução.

No modo de ionização negativo, não se detectou o íon correspondente ao *p*-hidroxibenzaldeído (*m/z* 120,9) e tempo de retenção 8,8 min. No modo de

ionização positivo, não se detectou o íon *m/z* 107,1 e tempo de retenção 3,5 min, correspondente ao carbocátion benzílico que seria formado após a eliminação de água do álcool *p*-hidroxibenzílico (produto provável).

Esse resultado demonstra que a levedura *S. cerevisiae* PE-2 é capaz de reduzir os aldeídos benzílicos, cujos principais produtos de biotransformação foram os respectivos alcoóis. Porém, pode-se verificar que a ela tem dificuldade na redução da carboxila benzílica.

Assim como ocorreu para a fermentação com a levedura *S. cerevisiae* de panificação, a adição do ácido *p*-hidroxibenzoico não inibiu a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, nas condições avaliadas. Ele alterou um pouco o perfil do crescimento microbiano, aumentando a o crescimento nas quatro primeiras horas e retardou a formação de ácido acético, o que tornou o pH final mais elevado que no teste controle. O resultado observado para o pH neste experimento foi similar ao observado para o experimento com o *p*-hidroxibenzaldeído. Concluiu-se ainda que, durante a fermentação, a levedura *S. cerevisiae* PE-2 não foi capaz de provocar transformações no ácido *p*-hidroxibenzoico, cuja concentração se manteve constante durante o processo.

Ando et al (1986) também investigaram o efeito do ácido *p*-hidroxibenzoico na fermentação de glicose a etanol pela *S. cerevisiae*. Comparado ao controle que apresentou uma fase *lag* de 18 h e fator de conversão de glicose em etanol de 53% do renimento teórico, o experimento com 1,0 $g.L^{-1}$ de ácido *p*-hidroxibenzoico apresentou fase *lag* de 22 h e fator de conversão de glicose em etanol de 37%. Os autores consideraram esse composto como um inibidor moderado.

Não encontramos outros trabalhos que investigaram a ação individual do ácido *p*-hidroxibenzoico em fermentações com a levedura *S. cerevisiae.* Porém, a despeito da falta de outras referências, nossos resultados vêm contribuir para informar que, mesmo em concentrações relativamente altas, como 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$, esse composto não se mostrou inibitório para a S. cerevisiae e em uma concentração mais próxima do que se encontraria em um hidrolisado, a *S. cerevisiae* PE-2 também não sofreu inibição desse composto na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$.

Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000) argumentaram que o ácido *p*-hidroxibenzoico é um bom composto modelo para o estudo de inibição de

derivados da degradação da lignina, visto que é um dos compostos formados em maior quantidade nos hidrolisados de madeiras duras.

Em estudo anterior, Palmqvist et al. (1999) argumentaram que o um elevado valor de massa celular inicial (inóculo grande) mascarou os resultados de inibição por três compostos utilizados por eles, para estudo de efeito individual e combinado: o ácido acético, o furfural e o ácido *p*-hidroxibenzoico. A concentração de inóculo considerada grande foi de 3,7 $g.L^{-1}$.

No presente trabalho, estudamos o efeito inibitório dos compostos fenólicos utilizando concentrações de massa celular em torno de 20 $g.L^{-1}$, e nas fermentações industriais brasileiras, os valores de concentração de massa celular no início do processo fermentativo também são bastante elevados.

Assim, o pouco efeito inibitório observado certamente também está associado ao tamanho de inóculo. Porém, mesmo assim, alguns compostos foram bastante inibitórios para a levedura de panificação (ácidos cumárico e ferúlico, principalmente) e para a cepa PE-2, será mostrado adiante que alguns ácidos foram inibitórios também.

Como ácido *p*-hidroxibenzoico não foi inibitório neste trabalho, discordamos dos autores supracitados, quanto à escolha desse ácido para representar o conjunto dos compostos fenólicos para estudos de inibição. Além disso, diversos autores, citados inclusive neste texto, mostram a estreita dependência dos efeitos inibitórios em relação ao tipo de composto, sua concentração, as condições de fermentação e o micro-organismo utilizado.

5.2.8. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de ácido vanílico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$

Os resultados para os experimentos na presença do ácido vanílico mostraram que a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2 foi bastante afetada.

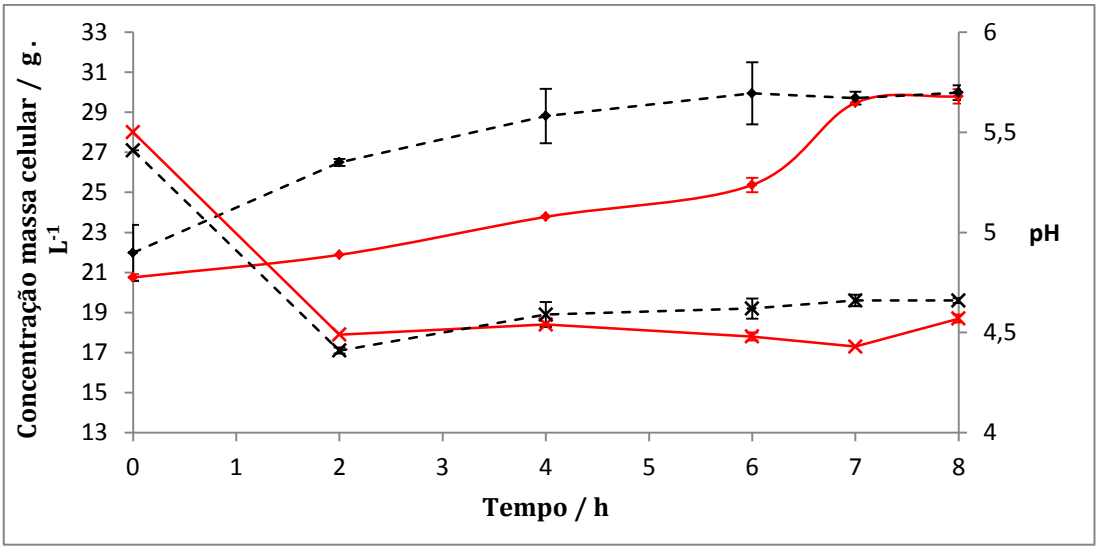
A Figura 5.16 mostra as curvas que foram obtidas para a fermentação.

O crescimento microbiano, na presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido vanílico, mostrou um comportamento bem distinto em relação ao controle (Figura 5.16 (b)). O crescimento foi menor do início da fermentação até 6 h do processo, conforme pode ser concluído pela menor inclinação da curva de crescimento no período indicado. Após 6 h, pode-se inferir que a levedura se adaptou à presença do ácido vanílico e, como a glicose presente no meio ainda fosse elevada (51,0 $g.L^{-1}$), ela apresentou um rápido crescimento entre 6 e 7 h.

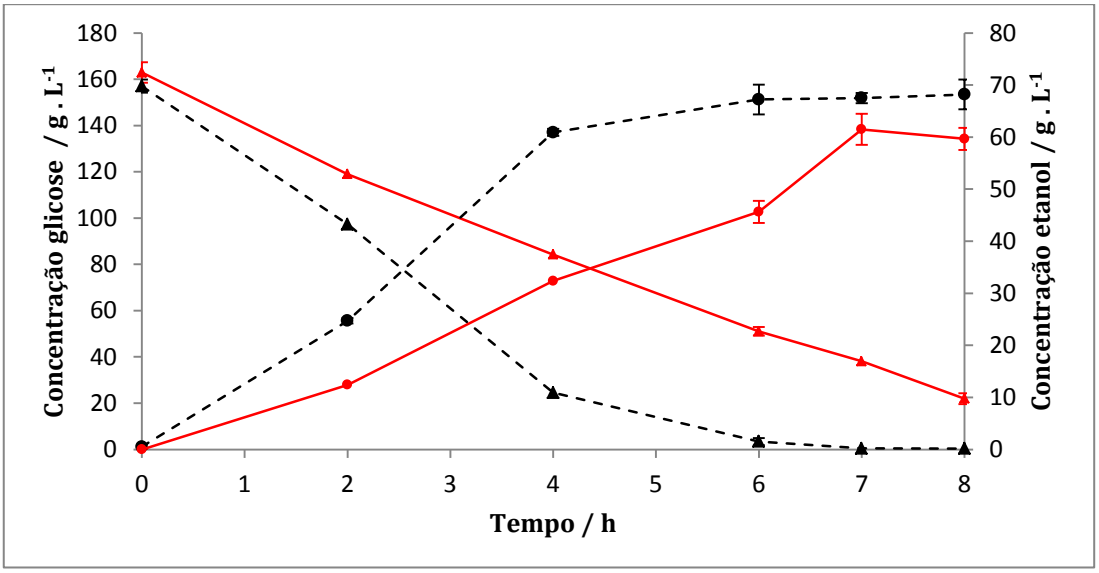
O pH, assim como em todos os outros experimentos, declinou nas duas primeiras horas de fermentação, mantendo-se com valores bem próximos ao alcançado em 2 h, até o final do processo fermentativo. Isso ocorreu para os testes sem e com a presença do ácido vanílico.

A Figura 5.16 (b) mostra que o perfil de consumo de glicose e de produção de etanol se alterou significativamente em relação ao controle. No controle, a levedura consumiu a glicose mais rapidamente até 4 h de fermentação, apresentando uma rápida produção de etanol no mesmo período. Após 4 h, o consumo de glicose e a produção de etanol se tornaram mais lentos, até que, após 6 h, a glicose fosse totalmente consumida e a concentração máxima de etanol atingida.

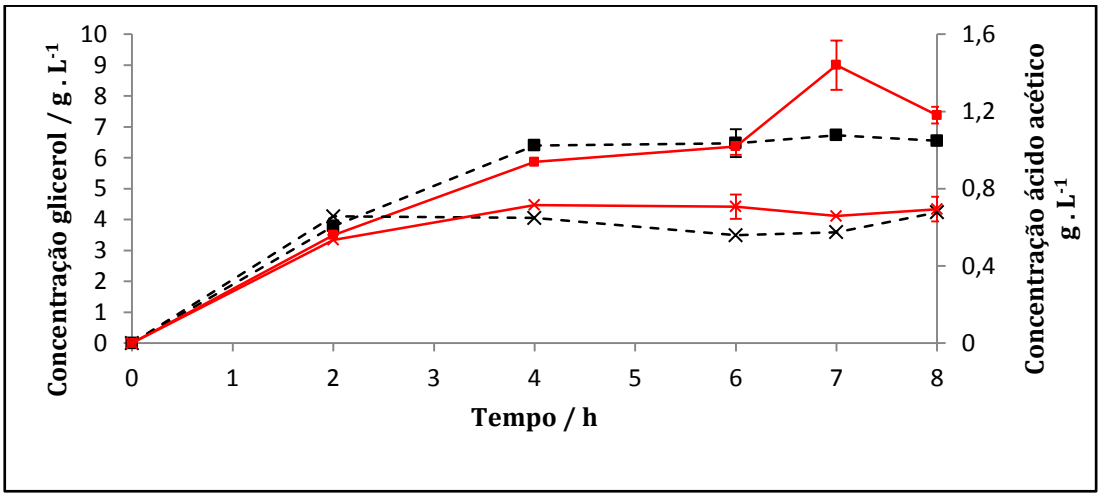
Com a presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido vanílico no meio fermentativo, a taxa de consumo de glicose e de produção de etanol foram negativamente afetadas. Apenas entre 6 h e 8 h de fermentação, a taxa de produção de etanol se elevou. O perfil do consumo de glicose se manteve constante e a glicose não foi completamente consumida após 8 h de fermentação.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.16 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência (tracejado) e presença de 0,1 g.L^{-1} de **ácido vanílico**. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (+); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (**x**).

Na Figura 5.16 (c) pode-se acompanhar a formação de glicerol e de ácido acético. Em massa, o maior desvio no consumo de glicose vai para a produção de glicerol. Essa produção foi similar para os dois testes, à exceção da amostra analisada após 7 h de fermentação, que apresentou um valor bem mais elevado de glicerol para a fermentação no meio com 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido vanílico.

A concentração do ácido acético se elevou mais rapidamente no teste controle nas duas primeiras horas do processo, mas o comportamento da formação desse subproduto foi bem próximo para os dois testes, atingindo, ao final de 8 h, praticamente a mesma concentração.

A Tabela 5.19 mostra os resultados experimentais dos parâmetros calculados para avaliar as fermentações para os testes controle e com adição de ácido vanílico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$.

Tabela 5.19 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido vanílico. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol e aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 6 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2 para o teste controle e após 8 h para o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido vanílico.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de ácido vanílico ($g . L^{-1}$)**	
	0,0	**0,1**
Glicose residual (g)	3 ± 3	22 ± 2
Glicose residual (%)	2 ± 2%	13 ± 1%
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	67 ± 3	60 ± 2
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	11,1 ± 0,5	7,5 ± 0,3
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,05 ± 0,02	0,064 ± 0,002
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,042 ± 0,003	0,052 ± 0,003
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,0036 ± 0,0005	0,0049 ± 0,0005
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,43 ± 0,02	0,42 ± 0,02
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	85 ± 2	83 ± 2

A produção máxima de etanol para o controle ocorreu após 6 h de fermentação e para o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ ácido vanílico, após 8 h. Assim, os parâmetros foram calculados para os tempos de 6 h no caso do controle e de 8 h, no caso do ácido vanílico.

A glicose residual percentual pode ser considerada nula para o teste sem a adição do ácido vanílico. A presença desse composto, porém, retardou a assimilação do substrato e, após 8 h de fermentação, ainda se detectou glicose no meio fermentativo.

A concentração máxima de etanol só foi atingida após 8 h de fermentação e, mesmo assim, o valor foi menor que o alcançado pelo controle em apenas 6 h. Dessa forma, a presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido vanílico provocou uma queda expressiva na produtividade volumétrica de etanol (- 32 ± 5 %).

O fator de conversão de glicose em células ficou dentro dos limites do erro experimental. Apesar de retardar o crescimento da levedura, o metabolismo da mesma privilegiou a formação de células após um período de adaptação. Como pode ser visto na Figura 5.16 (a), a taxa de crescimento celular, após 6 h de fermentação, se elevou de forma significativa.

Os desvios de glicose para a produção dos subprodutos avaliados neste trabalho, porém, sofreram aumento na presença de ácido vanílico, indicando que a levedura alterou seu metabolismo para lidar com a presença desse ácido.

A concentração de glicose permaneceu elevada por muito tempo, o que pode ter contribuído para que o desvio de glicose para glicerol aumentasse em 24 ± 10 %.

Já o desvio de glicose para a produção de ácido acético aumentou 36 ± 20 %.

Quanto ao principal produto da fermentação de glicose pela *S. cerevisiae* PE-2, o etanol, o fator de conversão de glicose permaneceu inalterado pela presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido vanílico. Assim, a baixa produção de etanol nas 6 primeiras horas, sugerindo um período de adaptação da levedura, foi compensada pela elevada produção de etanol após 6 h de fermentação.

Após a avaliação do processo fermentativo, a investigação centrou-se na possibilidade de bioconversão do ácido vanílico pela *S. cerevisiae* PE-2.

A partir da Figura 5.17, notou-se que a concentração de ácido vanílico diminuiu pouco ao longo do experimento. A diferença entre o maior (0,0823 g.L^{-1}; 0 h) e o menor (0,0661 g.L^{-1}; 7 h) valor detectado foi de 19,7%. E entre o valor inicial e o valor final (0,0712 g.L^{-1}; 8 h) foi de 13,5%.

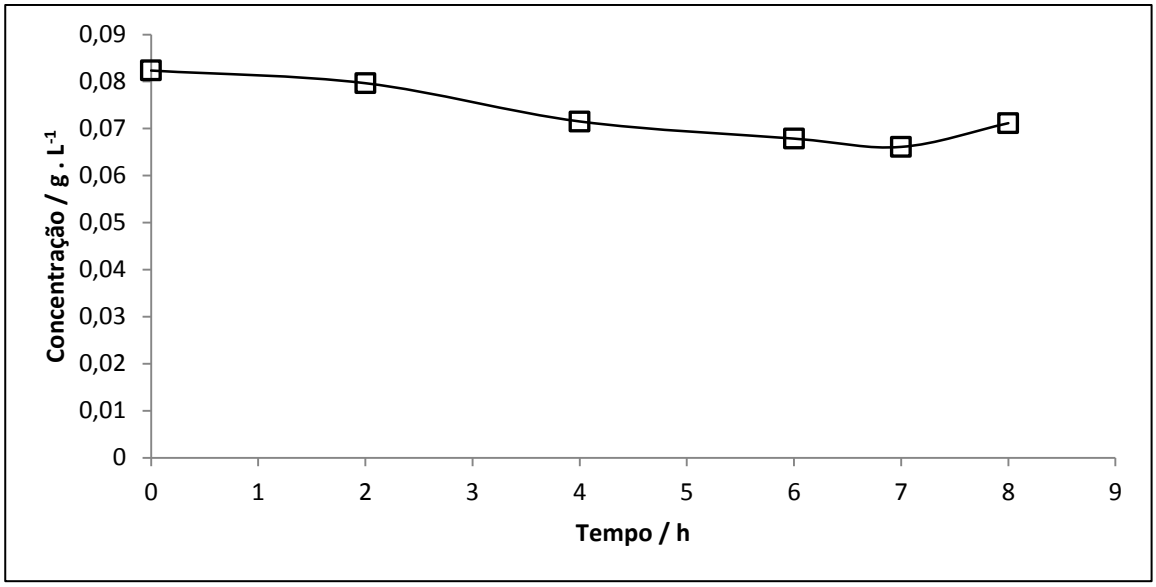


Figura 5.17 - Concentração de ácido vanílico (□) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 g.L^{-1} de ácido vanílico.

Somado a isso, não foram identificados, nos cromatogramas, os íons correspondentes aos possíveis produtos de redução, a vanilina e o álcool vanílico.

No modo de ionização negativo, não se detectou o íon correspondente à vanilina (*m/z* 151,1) e tempo de retenção 11,7 min. No modo de ionização positivo, não se detectou o íon *m/z* 137 e tempo de retenção 4,3 min, que seria associado ao carbocátion benzílico formado pela eliminação de água pelo suposto produto de redução, o álcool vanílico.

Esse resultado é coerente com o que foi observado para o ácido *p*-hidroxibenzoico e demonstra que a levedura *S. cerevisiae* PE-2 é capaz de reduzir os aldeídos benzílicos, cujos principais produtos de biotransformação foram os respectivos alcoóis. Porém, pode-se verificar que ela não conseguiu reduzir a carboxila benzílica.

Comparando os resultados para a *S. cerevisiae* PE-2 com os obtidos para a levedura de panificação, é intrigante notar que o ácido vanílico, mesmo em concentração mais baixa, e atuando sobre uma levedura reconhecidamente mais

resistente (BASSO et al, 1994; BASSO et al, 2008; AMORIM; LOPES, 2013), foi significativamente mais inibitório do que no estudo com a levedura de panificação. Para esta, a presença de ácido vanílico nas concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$ provocou uma redução na produtividade volumétrica, devido à dificuldade de assimilação do substrato, visto que a glicose residual foi elevada e, na concentração de 1,0 $g.L^{-1}$, aumentou o desvio de glicose para ácido acético.

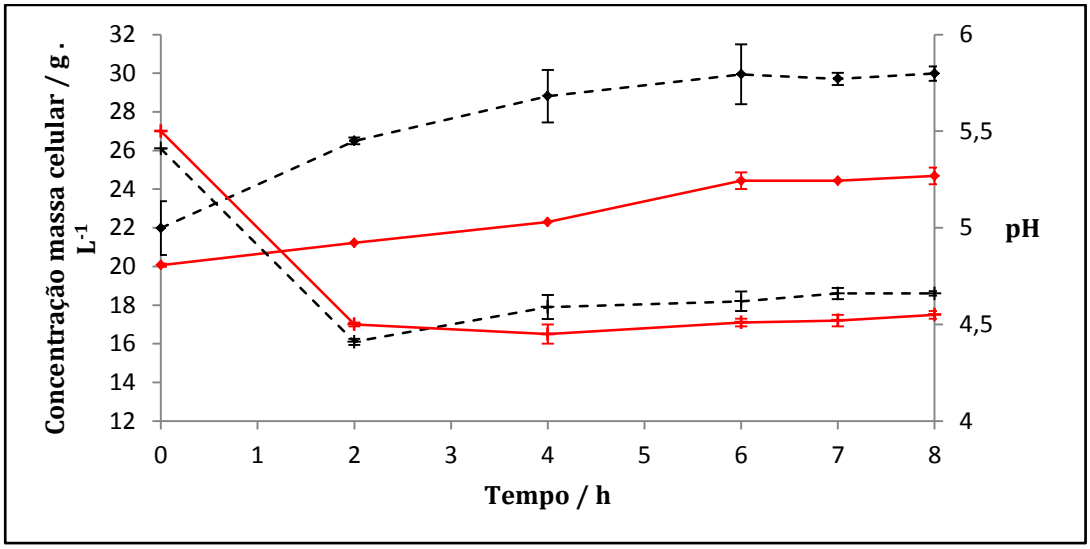
Para a *S. cerevisiae* PE-2, observou-se uma redução equivalente na produtividade volumétrica de etanol, porém com apenas 0,1 $g.L^{-1}$ do fenólico. Houve ainda um aumento no desvio de glicose para a formação dos subprodutos glicerol e ácido acético. Porém, para as duas linhagens de levedura, o ácido vanílico não inibiu nem o fator de conversão de glicose em células, nem o fator de conversão de glicose em etanol.

Ando et al. (1996) estudaram o efeito do ácido vanílico (1,0 $g.L^{-1}$) e reportaram um resultado semelhante ao que encontrou-se, neste trabalho, para a levedura de panificação. Relativo ao controle, cuja fase *lag* foi de 18 h e o fator de conversão de glicose em etanol foi de 53%, a presença do ácido vanílico alterou a fase *lag* para 19 h e o o fator de conversão de glicose em etanol foi de 52%, tendo sido considerado pelos autores como um inibidor fraco.

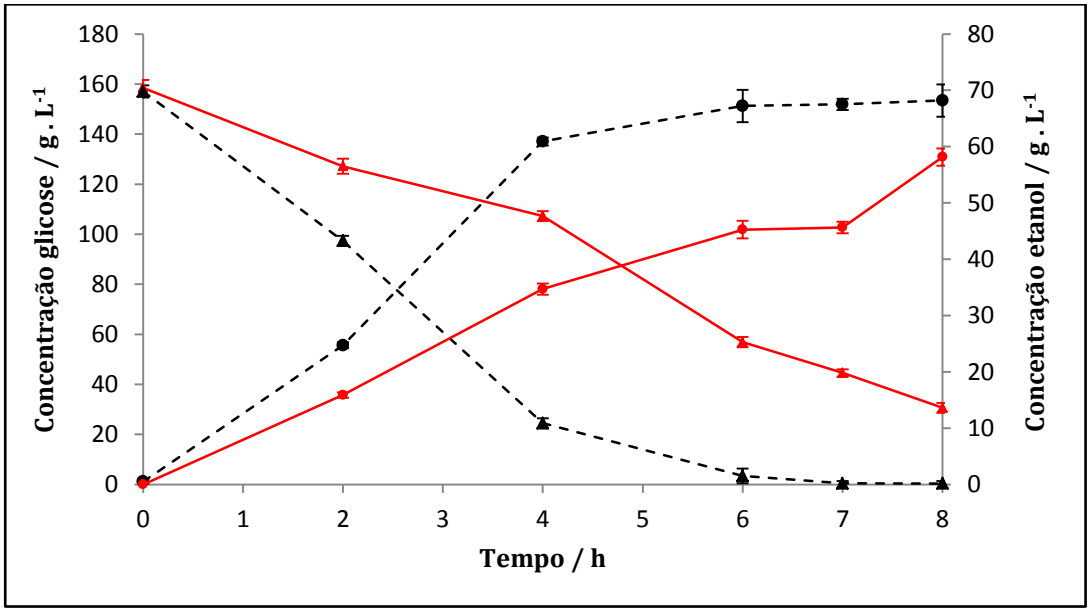
5.2.9. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de ácido siríngico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$

Assim como o ácido vanílico, o ácido siríngico afetou significativamente o perfil da fermentação de glicose a etanol pela *S. cerevisiae* PE-2.

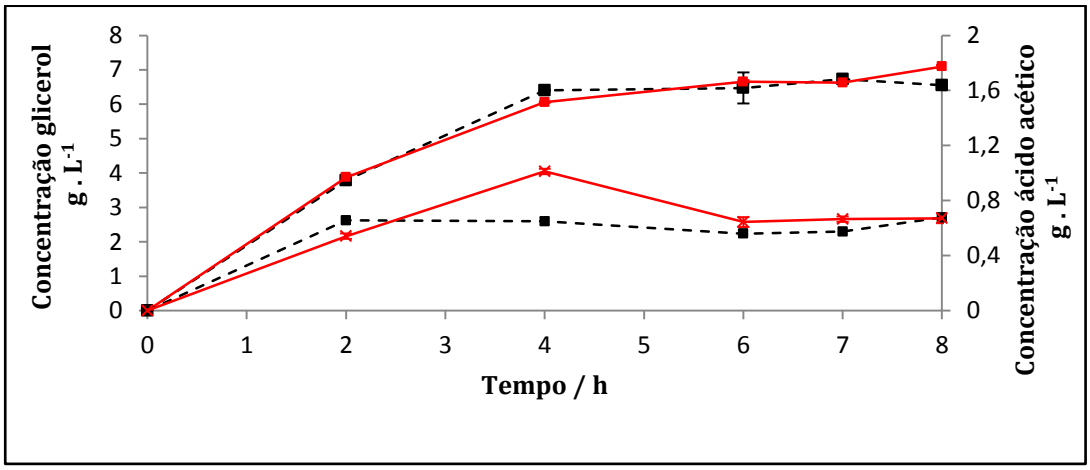
A Figura 5.18 mostra as curvas obtidas a partir dos dados experimentais.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.18 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência (tracejado) e presença de 0,1 g.L^{-1} de **ácido siríngico**. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (+); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (x).

Na Figura 5.18 (a), observou-se que o pH manteve um padrão de rápido decréscimo após 2 h. Esse comportamento pode ser observado para os testes sem e com a adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico. Porém, no caso do controle, ocorreu um pequeno aumento no pH após 2 h de fermentação e, após 4 h, o pH se manteve constante. Para o teste com a presença do ácido siríngico, ocorreu uma pequena diminuição no valor do pH, que pode ser considerado, então, constante até o final da fermentação.

A concentração de massa celular inicial foi de 20,07 ± 0,08 para o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico e de 22 ± 2 para o controle. Essa diferença inicial no valor da massa celular refletiu nas curvas de crescimento, que se mostraram bem afastadas uma da outra. Analisando a inclinação das curvas, percebeu-se que o crescimento microbiano foi afetado pela presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico, nas quatro primeiras horas de fermentação. Após 4 h, a inclinação da curva de crescimento foi bastante similar à do controle, o que pode indicar ter sido esse um período de adaptação da *S. cerevisiae* PE-2.

Na Figura 5.18 (b), as curvas do consumo de glicose e de formação de etanol, para o controle, mostram que a levedura consumiu o substrato e formou seu principal produto após 6 h de fermentação, quando a glicose residual pode ser considerada nula.

Para o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico, porém, esses perfis foram fortemente afetados. Nas quatro primeiras horas, a taxa de consumo de glicose e de formação de etanol foram bem menores que no controle, como ocorreu também, conforme já dito, para a formação de massa celular. A partir de 4 h, as taxas de consumo de glicose e de formação de etanol se elevaram, tornando-se maiores que as do controle. Esse fato pode ser explicado pela maior concentração do substrato após 4 h de processo.

Esse comportamento apresentado pelo consumo de glicose em função do tempo pode corroborar a hipótese de que a levedura demorou cerca de 4 h para se adaptar à presença do ácido siríngico no meio fermentativo.

Outro dado importante a se considerar é que o consumo de glicose ficou constante a partir de 6 h de fermentação e, após 8 h (última coleta de dados), ainda havia glicose no meio. Pela extrapolação da curva de consumo de glicose a partir da inclinação apresentada após 6 h, percebeu-se que a produção máxima

de etanol ainda seria atingida posteriormente, em torno de 10,5 h, quando a glicose residual seria nula. A Figura 5.19 ilustra esse raciocínio.

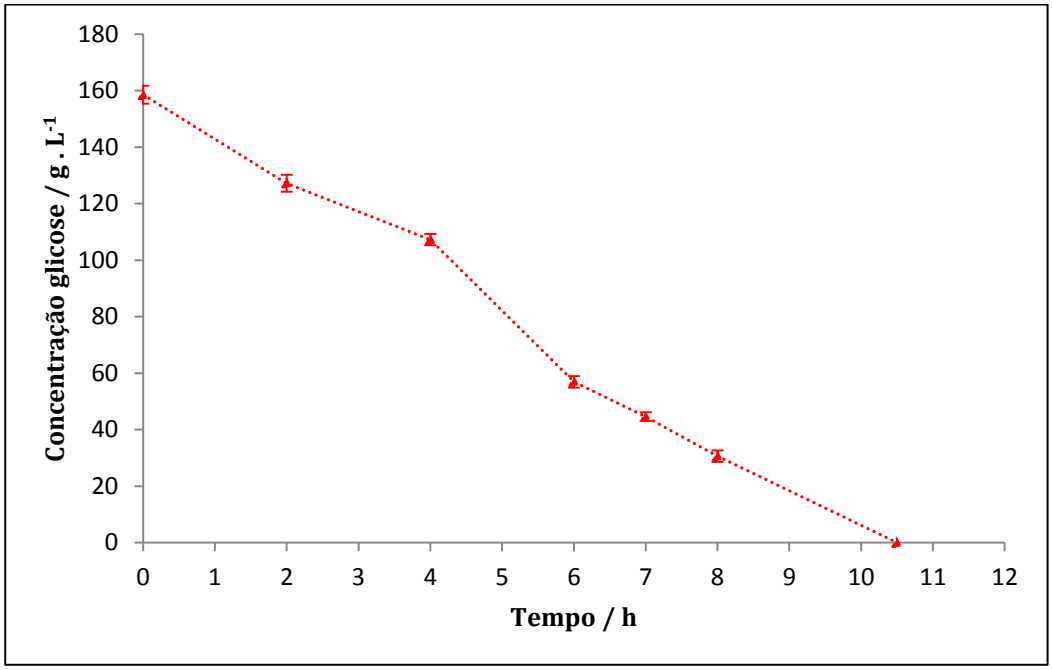


Figura 5.19 – Extrapolação da curva de consumo de glicose com a finalidade de estimar o tempo final da fermentação para o teste com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico.

A formação de glicerol, como pode ser visto na Figura 5.18 (c), não sofreu muita influência pela presença do ácido siríngico, apesar da manutenção das altas concentrações de glicose por um tempo mais elevado.

Na mesma figura, pode-se observar, porém, que ocorreu um pico de produção de ácido acético após 4 h de fermentação, o que explica a diminuição do pH registrada na Figura 5.18 (a).

Como a produção máxima de etanol ocorreu após 6 h de fermentação para o controle, os parâmetros para avaliação da fermentação foram calculados para esse tempo.

No caso do teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico, a última coleta de amostra ocorreu após 8 h de fermentação e, portanto, foi nesse tempo que se registrou a produção máxima de etanol, apesar de reconhecermos que essa produção provavelmente ocorreria após 10,5 h, conforme discutido anteriormente.

Os parâmetros de fermentação, mostrados na Tabela 5.20, foram calculados para 6 e 8 h de fermentação para os testes sem e com adição do ácido siríngico, respectivamente.

Tabela 5.20 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol e aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 6 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2 para o teste controle e após 8 h para o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de ácido siríngico ($g . L^{-1}$)**	
	0,0	**0,1**
Glicose residual (g)	3 ± 3	31 ± 2
Glicose residual (%)	2 ± 2%	19 ± 1%
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	67 ± 3	58 ± 2
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	11,1 ± 0,5	7,3 ± 0,2
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,05 ± 0,02	0,036 ± 0,004
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,042 ± 0,003	0,055 ± 0,002
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,0036 ± 0,0005	0,0052 ± 0,0003
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,43 ± 0,02	0,46 ± 0,02
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	85 ± 2	89 ± 2

A glicose residual percentual, como já foi sinalizado neste texto, ainda permaneceu elevada após 8 h de fermentação, mostrando o efeito inibitório do ácido siríngico sobre o consumo do substrato pela *S. cerevisiae* PE-2.

A concentração de etanol, mesmo com duas horas a mais de fermentação relativamente ao controle, atingiu um valor 22 ± 12 % menor.

O parâmetro que melhor refletiu o efeito inibitório do ácido siríngico a 0,1 $g.L^{-1}$ foi a produtividade volumétrica de etanol, que passou de 11,1 ± 0,5 no controle para 7,3 ± 0,2 $g.L^{-1}.h^{-1}$ na presença do inibidor, uma redução de 34 ± 5 %.

O fator de conversão de glicose em células e o fator de conversão de glicose em etanol, para os dois testes, mostrou valores aparentemente diferentes, mas devido ao desvio padrão associado a essas medidas, eles não podem ser diferenciados.

Já o desvio de glicose para a produção dos subprodutos aumentou em relação ao controle. O aumento foi de 31 ± 9 % para o desvio de glicose para glicerol e de 44 ± 17 % para o desvio de glicose para ácido acético.

Seguindo-se à avaliação dos parâmetros de fermentação, realizou-se a identificação e quantificação, por espectrometria de massas, do ácido siríngico adicionado ao meio fermentativo. Procuraram-se também os prováveis produtos de redução do ácido siríngico pela *S. cerevisiae* PE-2: siringaldeído e álcool siringílico.

A Figura 5.20 mostra que a variação da concentração do ácido siríngico durante a fermentação alcoólica foi mínima.

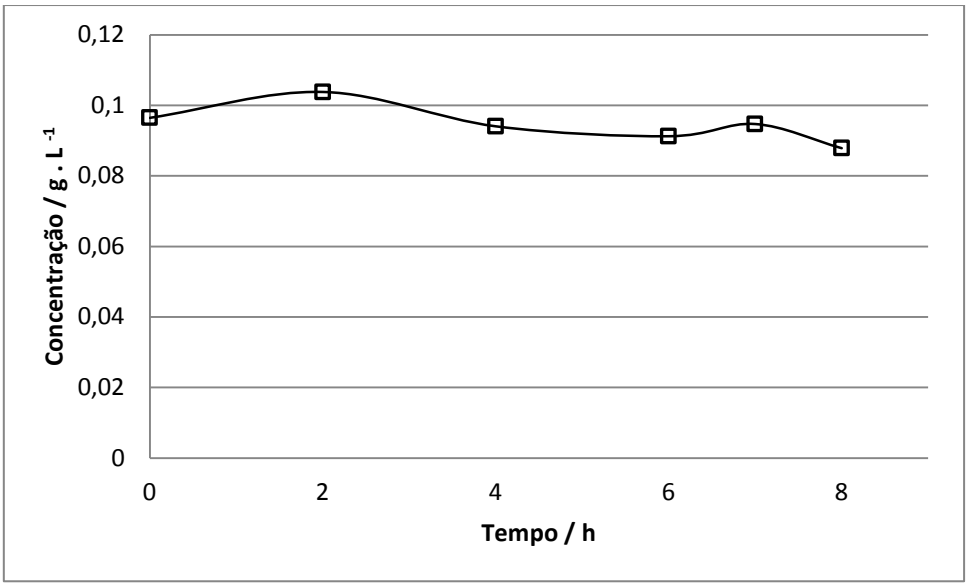


Figura 5.20 - Concentração de ácido siríngico (□) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido siríngico.

Notou-se que essa concentração manteve-se praticamente constante durante todo o experimento. A diferença entre o maior valor detectado (0,1038 $g.L^{-1}$; 2 h) e o menor (0,0878 $g.L^{-1}$; 8 h), foi de 15%.

Somado a isso, não foram identificados, nos cromatogramas, os íons correspondentes aos possíveis produtos de redução.

No modo de ionização negativo, não se detectou o íon correspondente ao siringaldeído (*m/z* 181,0) e tempo de retenção 14,1 min. No modo de ionização positivo, não se detectou o íon *m/z* 167 e tempo de retenção 4,8 min, que seria correspondente carbocátion benzílico formado a partir da eliminação de água pelo álcool siringílico.

Esse resultado foi obtido para todos os ácidos aqui estudados que apresentam carboxila benzílica: ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanílico e siríngico. Nenhum deles sofreu bioconversão na presença da levedura *S. cerevisiae* PE-2.

Os resultados para a levedura de panificação mostraram que apenas na concentração de 1,0 $g.L^{-1}$ o ácido siríngico se mostrou inibitório, diminuindo o fator de conversão de glicose em células em cerca de 50%, aumentando a glicose residual e diminuindo um pouco a produtividade volumétrica.

Ando et al (1986) estudaram os efeitos do ácido siríngico e, ao invés de inibir, ele provocou um pequeno aumento nos parâmetros avaliados. A fase lag caiu de 18 h (controle) para 17 h. O fator de conversão de glicose em etanol subiu de 53% para 62%. Apesar de estarem dentro do erro experimental, é interessante notar nos dados aqui apresentados (Tabela 5.20) que o fator de conversão de glicose em etanol tendeu a um aumento na presença do ácido siríngico.

Klinke et al. (2003), ao identificarem compostos formados a partir do pré-tratamento da palha de trigo por oxidação alcalina úmida (wet oxidation), realizaram ensaios fermentativos com os compostos identificados, adicionando-os individualmente ao meio, na presença da levedura *S. cerevisiae* ATCC 9658. Os ácidos vanílico e siríngico, juntamente com o ácido *p*-hidroxibenzoico, foram considerados os menos inibitórios, tendo causado um efeito ligeiramente negativo na produtividade volumétrica de etanol.

5.2.10. Perfila da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de ácido cumárico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$

Diferentemente dos ácidos vanílico e siríngico, o ácido cumárico afetou pouco a fermentação alcoólica da *S. cerevisiae* PE-2.

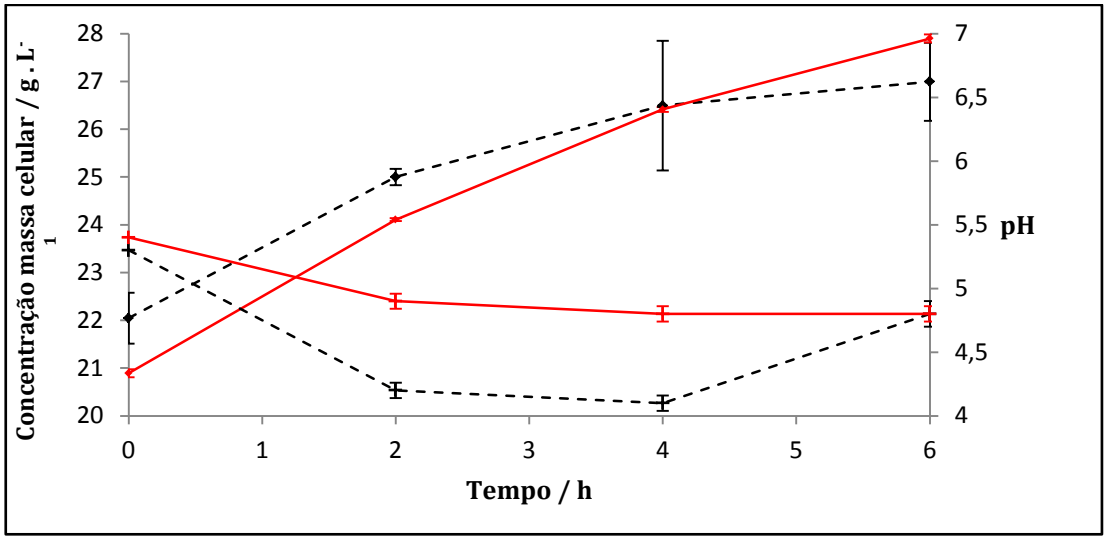
A Figura 5.21 mostra o comportamento em função do tempo, para a fermentação, para os testes sem e com ácido cumárico 0,1 $g.L^{-1}$.

Na Figura 5.21 (a), observou-se que a presença de ácido cumárico no meio fermentativo manteve o pH em valores mais elevados que os do controle, Porém, os dois testes atingiram o mesmo valor de pH após 6 h de fermentação.

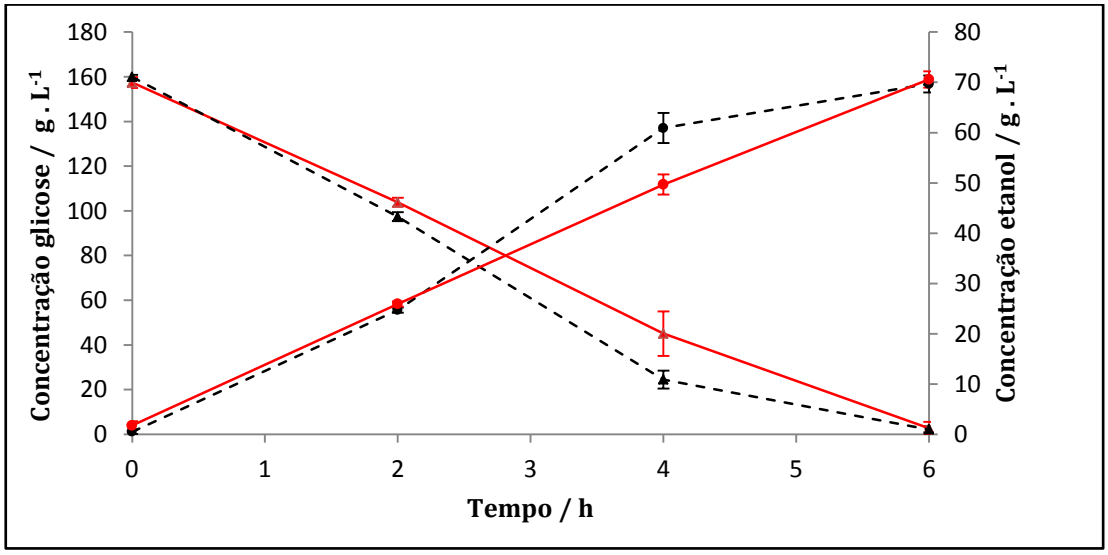
Ainda nesta figura, uma característica não observada antes aparece na fermentação na presença do ácido cumárico. O crescimento microbiano foi bem maior que o do controle. Notou-se que, mesmo partindo de um valor de biomassa menor, atingiu-se um valor maior ao final. Esse dado irá refletir no valor do fator de conversão de glicose em células que será mostrado na Tabela 5.21.

Na Figura 5.21 (b), observou-se que o consumo de glicose e a produção de etanol foram constantes para o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido cumárico. Já para o controle, ocorreu um aumento entre 2 e 4 h de fermentação, declinando lentamente a partir desse instante.

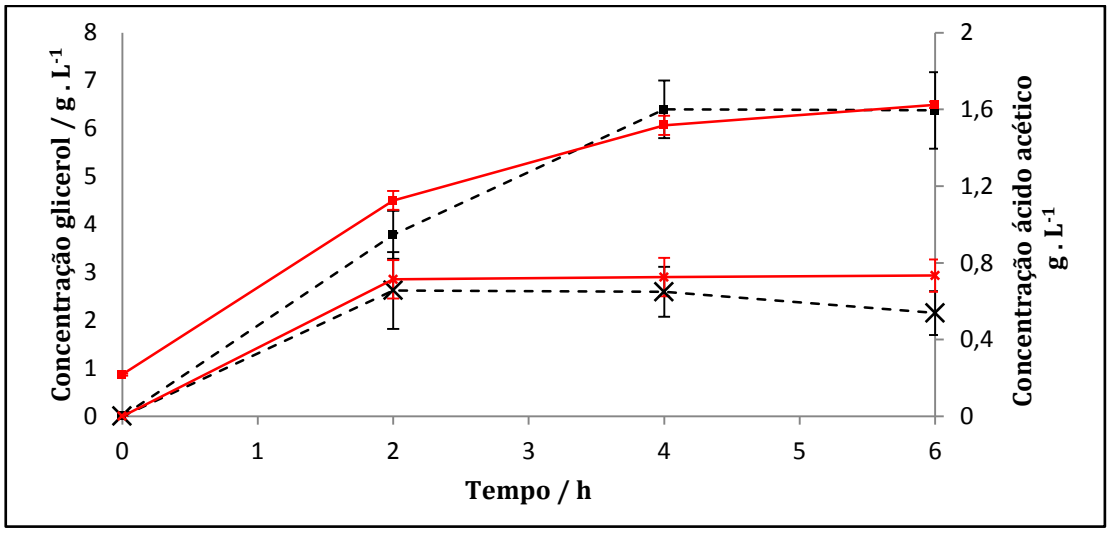
O perfil de formação dos subprodutos glicerol e ácido acético foram registradas na Figura 5.21 (c). Não se observou diferença significativa entre os dois testes.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.21 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência **(tracejado)** e presença de 0,1 g.L^{-1} de **ácido cumárico**. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (+); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (x).

A Tabela 5.21 mostra os resultados experimentais dos parâmetros calculados para avaliar as fermentações para os testes controle e com adição de ácido cumárico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$, nos quais a produção máxima de etanol ocorreu após de 6 h de fermentação. Assim, os parâmetros foram calculados para esse tempo.

Tabela 5.21 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido cumárico. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol e aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 6 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de ácido cumárico ($g . L^{-1}$)**	
	0,0	**0,1**
Glicose residual (g)	2 ± 1	3 ± 3
Glicose residual (%)	1 ± 1	2 ± 2
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	70 ± 2	71 ± 2
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	11,6 ± 0,3	11,8 ± 0,3
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,031 ± 0,006	0,045 ± 0,001
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,040 ± 0,005	0,042 ± 0,001
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,0038 ± 0,0008	0,0047 ± 0,0006
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,43 ± 0,01	0,44 ± 0,02
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	85 ± 1	87 ± 2

Conforme também pode ser visto na Figura 5.21 (b), a glicose residual após 6 h de fermentação pode ser considerada nula. A concentração de etanol e a produtividade volumétrica de etanol foram bastante elevadas, tanto para o controle quanto para o teste com 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido cumárico. Para todos os parâmetros avaliados, também não se observou qualquer diferença significativa, a não ser pelo fator de conversão de glicose em células. Na Figura 5.21 (a), notou-se que o aumento da massa celular foi bem maior para a fermentação à qual se adicionou o ácido cumárico. Assim, o fator de conversão de glicose em células sofreu um aumento de 45 ± 21 %.

Ao se avaliar a variação da concentração do ácido cumárico no meio de fermentação (Figura 5.22), observou-se um decréscimo da concentração, mostrando que a levedura transformou esse composto.

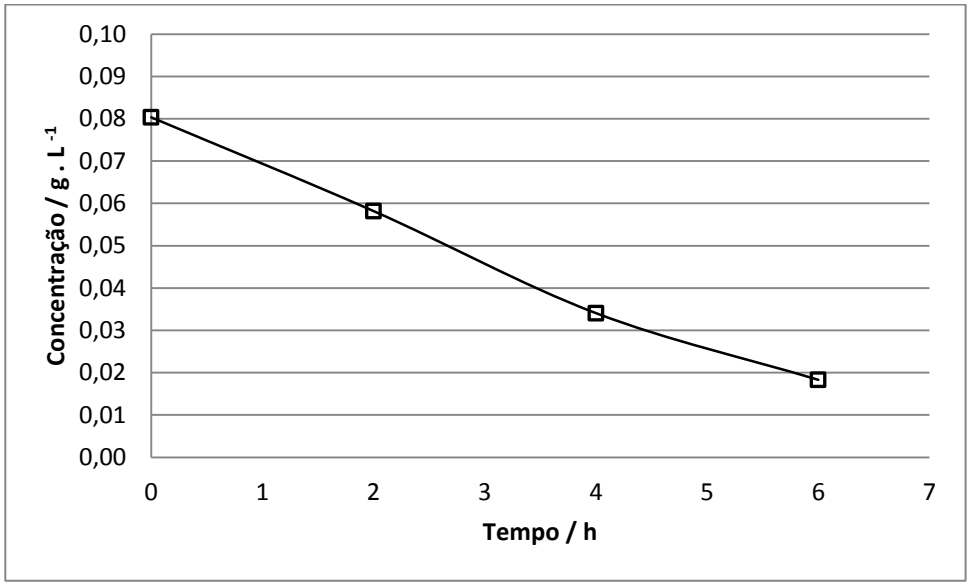
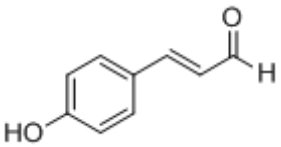


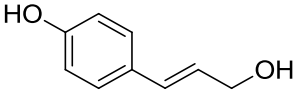
Figura 5.22 – Diminuição da concentração de ácido cumárico (□) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido cumárico.

Os prováveis produtos são os respectivos aldeídos e alcoóis, produtos da redução do ácido.

Nos modos de ionização negativo e positivo, procuraram-se os picos que poderiam corresponder aos produtos de redução. O aldeído cumarílico [29] (148,2 $g.mol^{-1}$) poderia ser encontrado pelos íons $[M-H]^-$ no modo negativo ou pelo íon $[M+H]^+$. Já o álcool cumarílico [30] (150,1 $g.mol^{-1}$), no modo positivo de ionização, sofreria eliminação de água, formando um carbocátion de *m/z* 133. Esses íons, porém, não foram encontrados.



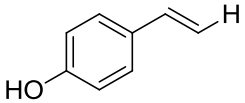
[29]



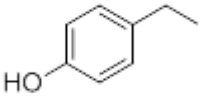
[30]

Mathew, Abraham e Sudheesh (2007) relataram ter encontrado no sistema final da fermentação alcoólica por *Debaryomyces hansenii* em presença de ácido

ferúlico, um composto formado a partir da descarboxilação desse ácido pelo micro-organismo. Como a estrutura do ácido cumárico é similar à do ácido ferúlico, julgou-se que seria razoável procurar por um composto que seria o produto da descarboxilação do ácido cumárico pela *S. cerevisiae* PE-2, o 4-vinil-hidroxibenzeno [31] (120,2 g.mol^{-1}) e o 4-etil-hidroxibenzeno [32] (122,2 g.mol^{-1}).



[31]



[32]

Encontrou-se o pico *m/z* 121,0 e tempo de retenção 8,94 min, no modo negativo de ionização, que poderia corresponder ao 4-etil-hidroxibenzeno. Porém, o mesmo pico foi encontrado no experimento controle, no qual não ocorreu a inoculação. Neste trabalho, não foi realizada a fragmentação para identificação do composto referente a esse pico.

Concluindo, a presença de ácido cumárico afetou apenas o fator de conversão de glicose em células, que aumentou 45 ± 21 %. A levedura *S. cerevisiae* PE-2 foi capaz de bioconverter o ácido cumárico presente no meio, porém neste trabalho não foi possível detectar os produtos dessa conversão.

Comparando com os resultados para a *S. cerevisiae* de panificação, o ácido cumárico exerceu um efeito inibitório severo para essa levedura, reduzindo o fator de conversão de glicose em células em cerca de 50% para das duas concentrações utilizadas (0,6 e 1,0 g.L^{-1}). Com uma glicose residual elevada, a levedura produziu mais glicerol, sofrendo uma queda significativa na produtividade volumétrica de etanol, de 22 ± 3 % e de 31 ± 1%, respectivamente. Como visto no parágrafo anterior, esses resultados contrastam com os obtidos para a cepa PE-2.

Larsson et al. (2000) também estudaram os efeitos da presença de ácido cumárico (0,02; 0,2; 1,0 g.L^{-1}) na fermentação de glicose a etanol pela levedura *S. cerevisiae* de panificação. (Os detalhes dos experimentos foram relatados no item 2.3.3 da revisão bibliográfica).

Na maior concentração estudada, 1,0 g.L^{-1}, o ácido cumárico reduziu a taxa de crescimento e a produtividade volumétrica de etanol em cerca de 63% relativamente ao controle. Na concentração de 0,2 g.L^{-1}, tanto a taxa de

crescimento quanto a produtividade foram afetados, mas a taxa de crescimento sofreu a maior queda. Na concentração de 0,02 $g.L^{-1}$, o ácido cumárico não alterou os valores dos parâmetros avaliados. Em todas as concentrações, os rendimentos de biomassa e de etanol, entretanto, permaneceram similares ao controle, dentro dos limites do erro experimental.

Esses autores não informaram se ocorreu bioconversão do ácido cumárico.

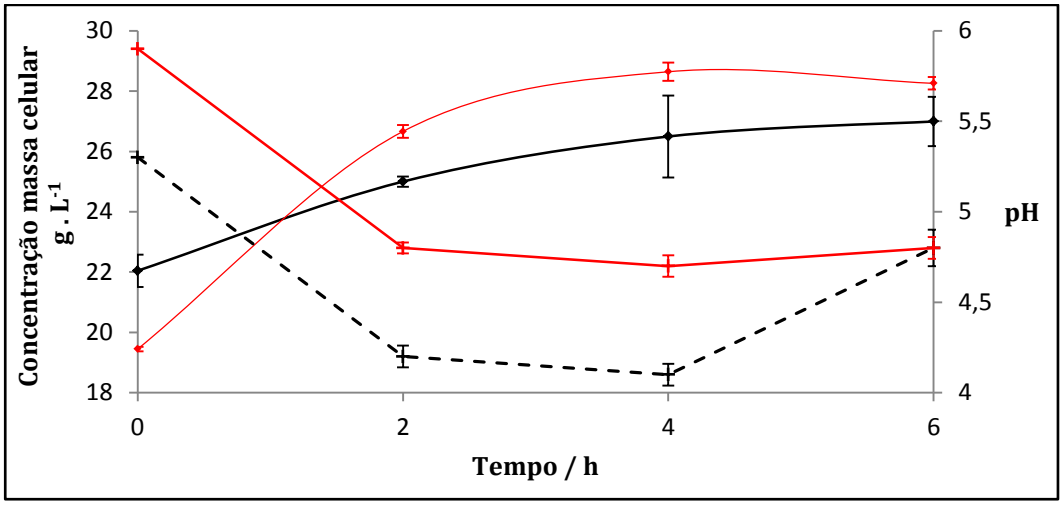
5.2.11. Perfil da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, com adição de ácido ferúlico na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$

Assim como o ácido cumárico, o ácido ferúlico afetou pouco a fermentação alcoólica da *S. cerevisiae* PE-2.

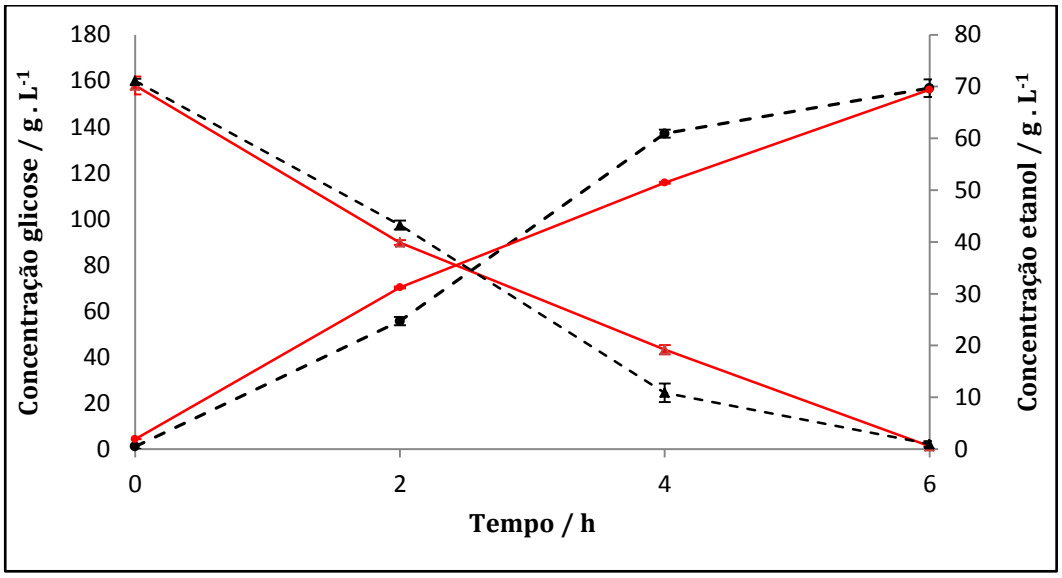
A Figura 5.23 mostra as curvas da fermentação, para os testes sem e com ácido ferúlico 0,1 $g.L^{-1}$.

Na Figura 5.23 (a), observou-se que a presença de ácido ferúlico no meio fermentativo manteve o pH em valores mais elevados que os do controle, até porque seu pH inicial foi ligeiramente mais alto. Porém, os dois testes atingiram o mesmo valor de pH após 6 h de fermentação.

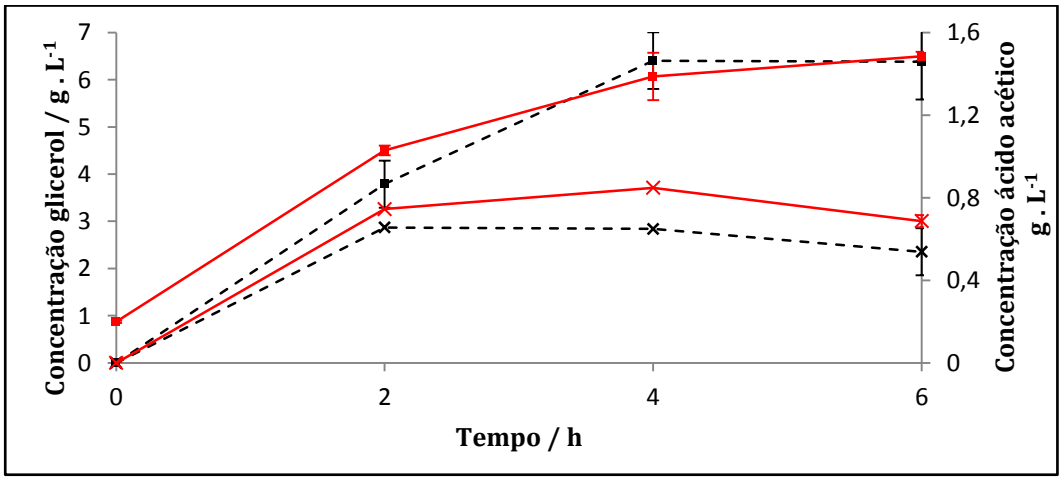
Ainda nesta figura, assim como ocorreu na fermentação em presença do ácido cumárico, o crescimento microbiano foi bem maior que o do controle. Notou-se que, mesmo partindo de um valor de biomassa menor, atinge-se um valor maior ao final. Como ocorreu para o teste com o ácido cumárico, esse dado irá refletir no valor do fator de conversão de glicose em células, que será mostrado na Tabela 5.22.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.23 - Perfil da fermentação alcoólica de glicose pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na ausência **(tracejado)** e presença de 0,1 g.L^{-1} de **ácido ferúlico**. **(a)** crescimento microbiano (♦) e pH (+); **(b)** produção de etanol (●) e consumo de glicose (▲); **(c)** produção de glicerol (■) e de ácido acético (x).

Na Figura 5.23 (b), comparando-se as inclinações das curvas que representam o teste com 0,1 g.L^{-1} do ácido ferúlico com o controle, notou-se que

o consumo de glicose e formação de etanol foi um pouco mais rápido do início até 2 h de processo. Após 2 h, tornou-se um pouco mais lenta que a do controle e, de após 4 h até o final do processo, foi novamente mais intensa que o controle.

Comparando esse comportamento das duas primeiras horas com os dados das curvas de formação dos subprodutos, Figura 5.23 (c), notou-se que ocorreu maior produção de glicerol e de ácido acético. Comparando-se com os dados das curvas da Figura 5.23 (a), também foi intensa a formação de massa celular nesse mesmo período. Ao final do processo, porém, a única diferença significativa foi na produção de massa celular.

A Tabela 5.22 mostra os resultados experimentais dos parâmetros calculados para avaliar as fermentações para os testes controle e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido ferúlico, nos quais a produção máxima de etanol ocorreu para o tempo de 6 h de fermentação. Assim, os parâmetros foram calculados para esse tempo.

A glicose residual pode ser considerada nula ao final de 6 h de fermentação. E, como ocorreu para a fermentação na presença de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido cumárico, o único parâmetro que diferencia os dois testes foi o fator de conversão de glicose em células.

Conforme foi analisado nas curvas de crescimento microbiano, Figura 5.21 (a), o aumento da massa celular foi bem maior para a fermentação à qual se adicionou o ácido ferúlico. A partir dos rendimentos do controle e o teste com o ácido ferúlico, calculou-se um aumento de 81 ± 26 %.

Tabela 5.22 – Resultados para os experimentos sem e com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido ferúlico. Valores referentes à glicose residual em massa e percentual; à concentração de etanol; à produtividade volumétrica de etanol e aos rendimentos de massa celular, de glicerol, de ácido acético e de etanol, em relação à massa de glicose consumida. Resultados após 6 h de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* PE-2.

Parâmetros de fermentação	**Concentração de ácido ferúlico ($g . L^{-1}$)**	
	0,0	**0,1**
Glicose residual (g)	2 ± 1	1,24±0,05
Glicose residual (%)	1 ± 1	0,78±0,03%
Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)	70 ± 2	69,4±0,2
Produtividade volumétrica - Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	11,6 ± 0,3	11,56±0,03
Fator de conversão de glicose em células – $Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}_{glicose}$)	0,031 ± 0,006	0,056±0,002
Desvio de glicose para glicerol - $Y_{glicer/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,040 ± 0,005	0,041±0,001
Desvio de glicose para ácido acético - $Y_{ác.acét/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,0038 ± 0,0008	0,0044±0,0002
Fator de conversão de glicose em etanol - $Y_{et/S}$ ($g. g^{-1}_{glicose}$)	0,43 ± 0,01	0,43±0,01
Eficiência de conversão de glicose em etanol (% teórico)	85 ± 1	84±1

Ao se avaliar a variação da concentração do ácido ferúlico no meio de fermentação (Figura 5.22), observou-se um decréscimo da concentração, mostrando que a levedura transformou esse composto.

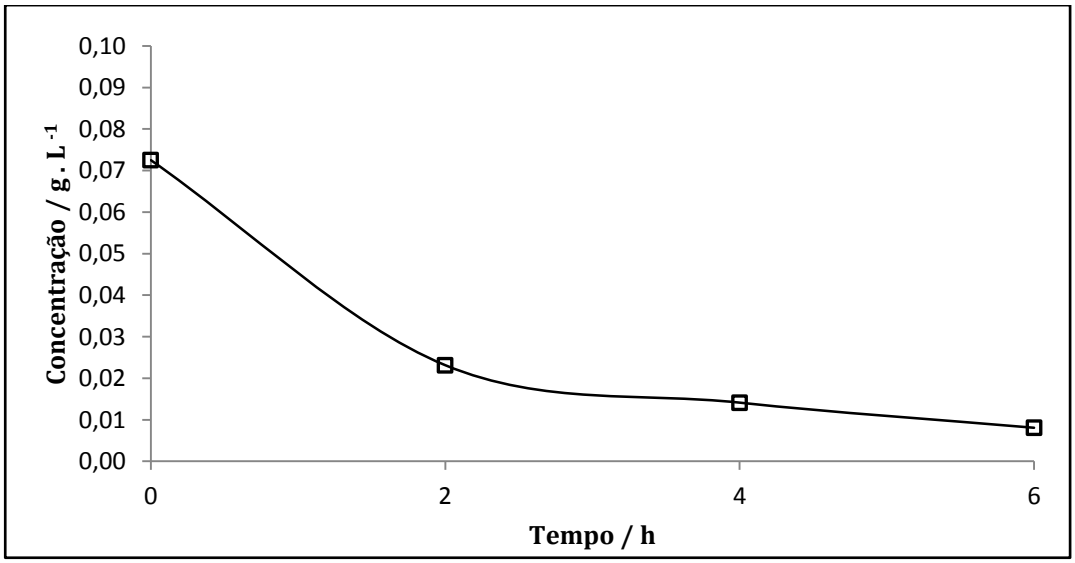
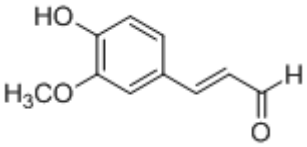


Figura 5.24 - Concentração de ácido ferúlico (□) durante a fermentação alcoólica de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Meio fermentativo preparado com adição de 0,1 $g.L^{-1}$ de ácido ferúlico.

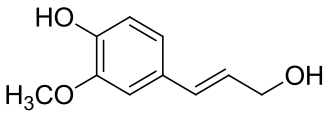
Já na amostra inicial, notou-se que a concentração do ácido ferúlico foi menor do que a concentração adicionada (0,1 $g.L^{-1}$). Após 6 h de fermentação, restaram apenas quantidades traço desse composto (0,0081 $g.L^{-1}$).

Os prováveis produtos são os respectivos aldeídos e alcoóis, produtos da redução do ácido e, conforme encontrado por Mathew, Abraham e Sudheesh (2007), seria possível a formação de um composto por descarboxilação do ácido ferúlico, o 4-vinilguaiacol [36].

Nos modos de ionização negativo e positivo, procuraram-se os picos que poderiam corresponder aos produtos de redução. O aldeído coniferílico [33] (178,1 $g.mol^{-1}$) poderia ser encontrado pelos íons $[M-H]^-$ no modo negativo ou pelo íon $[M+H]^+$. Já o álcool coniferílico [34] (180,1 $g.mol^{-1}$), no modo positivo de ionização, sofreria eliminação de água, formando um carbocátion de *m/z* 163. Esses íons, porém, não foram encontrados.

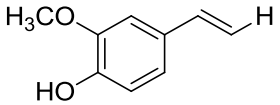


[33]

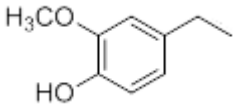


[34]

Como possíveis produtos da descarboxilação do ácido ferúlico, seriam encontrados os compostos 4-vinilguaiacol [35] (150,1 $g.mol^{-1}$) e o 4-etilguaiacol [36] (152,1 $g.mol^{-1}$).



[35]



[36]

Concluindo, a presença de ácido ferúlico afetou apenas o fator de conversão de glicose em células, que aumentou 81 ± 26 %. A levedura *S. cerevisiae* PE-2 foi capaz de bioconverter o ácido ferúlico presente no meio, porém, neste trabalho, não foi possível detectar os produtos dessa conversão.

Neste trabalho, para a levedura de panificação, o ácido ferúlico foi altamente inibitório. A elevada concentração residual de glicose provavelmente

provocou um estresse osmótico muito grande no micro-organismo, que produziu glicerol com rendimento de 48 a 74% superior ao controle, respectivamente para as concentrações de 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$. O fator de conversão de glicose em células foi reduzido em cerca de 50% para a concentração de 1,0 $g.L^{-1}$. Para ambas, porém, a produtividade volumétrica decresceu significativamente.

A influência da presença de ácido ferúlico na fermentação de glicose a etanol pela levedura *S. cerevisiae* de panificação foi estudada por Larsson et al. (2000). Esses autores investigaram fermentações contendo 0,02, 0,2 e 1,0 $g.L^{-1}$ de ácido ferúlico. (Conforme informado no item anterior, os detalhes dos experimentos foram relatados no item 2.3.3 da revisão bibliográfica).

Em todas as concentrações estudadas, o fator de conversão de glicose em etanol não foi afetado. Na menor concentração, nenhum dos parâmetros se alterou. Com 0,2 $g.L^{-1}$ de ácido ferúlico, porém, ocorreu uma redução nos parâmetros que dependem do tempo, que passaram a ter os seguintes valores percentuais relativos ao controle: taxa de crescimento (64%) e produtividade volumétrica de etanol (46%). Entretanto, também ocorreu um decréscimo do fator de conversão de glicose em células, cujo valor foi cerca de 83% do valor de referência. Na concentração de 1,0 $g.L^{-1}$, o ácido ferúlico foi fortemente inibitório, sendo o fator de conversão de glicose em células apenas 10% do valor de referência e a produtividade volumétrica, 20%.

Os resultados encontrados por Larsson et al. (2000) são em grande medida coincidentes com os que encontramos para a levedura de panificação. Já a cepa PE-2 mostrou grande tolerância à presença do ácido ferúlico no meio fermentativo, assimilando-o durante as 8 h do ensaio.

Para dar fechamento a este capítulo, apresentaremos a Tabela 5.23, uma tabela resumo similar à construída para os resultados da levedura de panificação (Tabela 5.11). A Tabela 5.23, portanto, resume os resultados das fermentações de glicose a etanol pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, na presença dos oito compostos fenólicos estudados, adicionados individualmente na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$. A partir dessa tabela, fica evidente que o fator de conversão de glicose em etanol não foi afetado por nenhum dos oito compostos. O fator de conversão de glicose em células, por sua vez, foi afetado apenas pelos ácidos cumárico e ferúlico e, mesmo assim, positivamente. Os parâmetros que dependem do tempo, mais uma vez, foram os que sofreram maior variação.

Tabela 5.23 – Resumo dos resultados. Os valores mostrados indicam a variação percentual do valor em comparação com o controle. Dados para a levedura *S. cerevisiae* PE-2. Todos os compostos foram adicionados na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$.

Variação dos parâmetros de avaliação das fermentações relativamente ao controle de cada experimento								
Composto fenólico	**Bioconversão pela cepa PE-2**	**Identificação dos produtos formados**	**($g.g^{-1}$ de glicose)**				**Concentração ($g.L^{-1}$) e produtividade volumétrica de etanol ($g.L^{-1}.h^{-1}$)**	**Glicose residual (% da glicose inicial)**
			Massa de células	**Glicerol**	**Ácido acético**	**Etanol**		
***p*-hidroxibenzaldeído**	SIM	Álcool *p*-hidroxibenzílico Ácido *p*-hidroxibenzoico	----------	----------	+ 25 ± 6 %	----------	----------	----------
Vanilina	SIM	Álcool vanílico Ácido vanílico	----------	----------	----------	----------	- 23 ± 5 %	----------
Siringaldeído	SIM	Álcool siringílico Ácido siríngico	----------	----------	+ 67 ± 12 %.	----------	----------	----------
Ácido *p*-hidroxibenzoico	NÃO		----------	----------	----------	----------	----------	----------
Ácido vanílico	NÃO		----------	+ 24 ± 10 %.	+ 36 ± 20 %	----------	- 32 ± 5 %	----------
Ácido siríngico	NÃO		----------	+ 31 ± 9 %	+ 44 ± 17 %	----------	- 34 ± 5 %	----------
Ácido cumárico	SIM	Não identificados	+ 45 ± 21 %.	----------	----------	----------	----------	----------
Ácido ferúlico	SIM	Não identificados	81 ± 26 %.	----------	----------	----------	----------	----------

---------- Indica que não houve efeito significativo.

6. Conclusão

Os resultados neste trabalho possibilitaram obter conclusões acerca da influência dos compostos fenólicos em relação a cada uma das leveduras utilizadas na investigação. Possibilitou, ainda, concluir quais são os compostos que a levedura *S. cerevisiae* PE-2 é capaz de bioconverter, identificando alguns dos produtos dessa conversão.

Efeitos inibitórios para a levedura *S. cerevisiae* de panificação:

- O *p*-hidroxibenzaldeído e o ácido *p*-hidroxibenzoico não foram tóxicos nas duas concentrações testadas: 0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$; e o ácido siríngico não foi tóxico na concentração de 0,6 $g.L^{-1}$.

- Os outros compostos que apresentaram efeitos inibitórios na fermentação de glicose a etanol foram: vanilina, siringaldeído, ácido vanílico, ácido siríngico (1,0 $g.L^{-1}$), ácido cumárico e ácido ferúlico. O principal efeito inibitório foi dificultar o consumo de glicose pela levedura, resultando em valores de glicose residual percentual bem mais elevados que nos respectivos controles, reduzindo a produtividade volumétrica de etanol.

- A vanilina, o siringaldeído e o ácido vanílico (1,0 $g.L^{-1}$) também provocaram o aumento do desvio de glicose para ácido acético.

- A vanilina (1,0 $g.L^{-1}$) aumentou o fator de conversão de glicose em células.

- Os ácidos siríngico e ferúlico (1,0 $g.L^{-1}$) e o ácido cumárico (0,6 e 1,0 $g.L^{-1}$) também inibiram fortemente o crescimento microbiano (~50%), além de aumentarem o desvio de glicose para glicerol. Os ácidos cumárico e ferúlico foram os que apresentaram o maior efeito inibitório.

Efeitos inibitórios para a levedura *S. cerevisiae* PE-2:

- Os compostos *p*-hidroxibenzaldeído, siringaldeído, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido cumárico e ácido ferúlico não apresentaram toxicidade na concentração de 0,1 $g.L^{-1}$.

- Na concentração testada (0,1 $g.L^{-1}$), a vanilina, o ácido vanílico e o ácido siríngico provocaram a queda da produtividade volumétrica de etanol, devido à dificuldade inicial em consumir o substrato.

- Os ácidos vanílico e siríngico, porém, foram bastante inibitórios e, além de dificultarem o consumo da glicose e reduzirem a produtividade volumétrica de etanol, aumentaram os rendimentos de glicerol e ácido acético.

- Os ácidos cumárico e ferúlico não se mostraram inibitórios. Porém, eles alteraram o metabolismo microbiano, ao provocarem um aumento expressivo do rendimento celular (~ 45 e 80%).

Conclusões sobre a bioconversão dos compostos fenólicos pela *S. cerevisiae* PE-2:

- A levedura *S. cerevisiae* PE-2 não foi capaz de realizar a bioconversão dos ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanílico e siríngico. Concluiu-se, portanto, que essa levedura apresenta dificuldade em reduzir carboxila benzílica.

- A bioconversão dos aldeídos, porém, ocorreu muito rapidamente no meio. O siringaldeído foi detectado apenas na amostra do tempo inicial e o *p*-hidroxibenzaldeído foi quase totalmente convertido após 2 h de fermentação, restando apenas quantidades traço. Concluiu-se, portanto, que apesar de não conseguir reduzir a carboxila benzílica, a *S. cerevisiae* PE-2 é muito eficiente em converter os aldeídos benzílicos.

- A bioconversão dos aldeídos (*p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído) resultou em seus produtos de oxidação (ácidos carboxílicos) e de redução (alcoóis).

- Em relação ao rendimento teórico a partir das quantidades adicionadas dos aldeídos, o rendimento de formação do ácido *p*-hidroxibenzoico foi de 25%, do ácido vanílico foi de 18% e do ácido siríngico foi de 3,6%. Os alcoóis formados foram identificados, mas não quantificados. Portanto, visto que a quantidade formada dos respectivos ácidos foi muito pequena, infere-se que o principal produto de bioconversão dos aldeídos são seus respectivos alcoóis.

- A levedura *S. cerevisiae* PE-2 foi capaz de converter os ácidos cumárico e ferúlico, mas neste trabalho não foram identificados seus produtos de bioconversão.

Como conclusão geral, pode-se dizer que os compostos fenólicos afetaram mais a produtividade volumétrica de etanol do que o fator de conversão de glicose em células. O fator de conversão de glicose em etanol não foi afetado por nenhum dos compostos. Alguns provocaram um maior desvio de glicose para a formação de glicerol e de ácido acético. Concluiu-se, portanto, que a inibição dos processos fermentativos não depende apenas da natureza do composto, mas também de sua concentração e do tipo de micro-organismo utilizado.

Referências

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; GODOY, A.; CHERUBIN, A. R. ; LOPES, M. L. Identification and selection of yeast strains from alcoholic fermentations in Brazil by electrophoretic karyotyping. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON YEASTS, 11, 2004, Rio de Janeiro, RJ. **Yeasts in science and technology**. v. 1. p. 51-51.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol. Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol. In: SIMPÓSIO MICRORGANISMOS EM AGROENERGIA: da Prospecção aos Bioprocessos; editor, João Ricardo Moreira de Almeida, 2013, Brasília, **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013, p. 42-59.

ANDO, S.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAI, S. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influence on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* – **J. Ferment. Technol**., v. 64, p. 567 – 570, 1986.

BACCAN, N., ANDRADE, J.C., GODINHO, O.E.S., BARONE, J.S. **Química analítica quantitativa elementar**. São Paulo: Ed. Blucher, 2001.

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.

BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; ORELLI, V. F.; CAMPOS, A. A.; GALLO, C. R.; AMORIM, H. V. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., 1993, Águas de São Pedro. **Anais**... Piracicaba: Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, 1994. p. 246-250.

BOYER, L. J.; VEGA, J. L.; KLASSON, K. T.; CLAUSEN, E.C; GADDY, J. L. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biomass Bioenergy**, v. 3, p. 41-48, 1992.

BRASIL – Ministério de Minas e Energia. **Cadernos de Energia EPE Perspectivas para o Etanol no Brasil. 2008**. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/Petroleo/Documents/Estudos_28/Cadernos%20de%20Energia%20-%20Perspectiva%20para%20o%20etanol%20no%20Brasil.pdf> Acesso em 03.mar.2010.

BUTTERFIELD, B. G; MEYLAN, B.A. **Three-dimensional structure of wood**. 2nd ed. New York: Chapman and Hall, 1980.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Prospecção tecnológica:** Biocombustíveis. Avaliação da Expansão da Produção de Etanol no Brasil. 2004. Disponível em: <http://www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1833>. Acesso em 03.mar. 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-acúcar, terceiro levantamento.** Brasília, dez. 2013, p.1-15. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_20_10_56_08_boletim_cana_portugues_-_dez_2013_3o_lev_-_original.pdf > Acesso em 17.jan.2014.

MISSÃO e visão do CTBE. Disponível em <http://ctbe.cnpem.br/o-ctbe/missao-e-visao/> CTBE. Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol. Acesso em 01.junho.2014.

CUNHA, H. C. M. **Caracterização do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: identificação de inibidores potenciais de processos fermentativos e enzimáticos**. 1999. Dissertação (Mestrado). Faenquil: Lorena, S.P., 1999.

CUNHA, H.C.M. **Caracterização do hidrolisado hemicelulósico e do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: avaliação do poder inibitório dos compostos aromáticos de baixa massa molar em processos fermentativos**. Tese (Doutorado). 2005. Faenquil: Lorena, S.P., 2005.

DAHLGREN, R.M.T.; CLIFFORD H.T.; YEO P.F. - **The families of the monocotyledons**: structure, evolution and taxonomy. Berlin: Springer-Verlag, 1985. 520p.

DECLARATION of the United Nations Conference on the Human Environment. Disponível em: <http://legal.un.org/avl/ha/dunche/dunche.html> Acesso em 20.maio.2014.

DE WULF, 0.; THONART, P.; GAIGNAGE, P.; MARKER, M.; PARIS, A.; PAQUOT, M. Bioconversion of vanillin to vanillyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae.* **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, v. 17, p. 605-616, 1986.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 19, n. 3, p. 220-225, 1996.

FENGEL, D.; WEGENER, G. – **Wood:** chemistry, ultrastructure, reactions. New York: Gruyter, 1989.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science** v. 315, n. 5813, 808-10. 2007. Errata em: **Science**, v. 317, n. 5843, p. 1325. 2007.

HAHN HÄGERDAL, B.; OLSSON, L. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 18, p. 312-331. 1996.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Key world energy statistics**. Paris, 2013, 80 p. Disponível em: <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld2013.pdf> Acesso em 15.jan.2014.

KLINKE, H.; OLSSON, L.; THOMSEN, A.; AHRING, B. Potential Inhibitors From Wet Oxidation of Wheat Straw and Their Effect on Ethanol Production of *Saccharomyces cerevisiae*: Wet Oxidation and Fermentation by Yeast. **Biotechnol Bioeng**, v. 81, n. 6, p. 738-747, 2003.

KYOTO Protocol. Disponível em: <http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php > Acesso em 20.maio.2014.

LARSSON, S.; QUINTANA-SÁINZ, A.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.; JÖNSSON, L.J. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, p. 617-632, 2000.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A., AQUARONE E.; BORZANI, W.; SHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. v.3, Cap. 1.

LIU, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 90, n. 3, p. 809-825, 2011.

LIU, Z.L.; MOON J; ANDERSH, A.J.; SLININGER, P.J.; WEBER, S. Multiple gene mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and HMF by ethanologenic yeast Saccharomyces cerevisiae. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 81, p. 743–753, 2008 a.

LIU, Z.L.; SAHA, B.C.; SLININGER, P.J. **Lignocellulosic biomass conversion to ethanol by Saccharomyces**. In: Wall, J; Harwood, C.; Demain, A. (eds) Bioenergy. Washington DC: ASM Press, p. 17– 36, 2008 b.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E.; SUDHEESH, S. Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. **J. Mol. Catal**, v.44, 48−52, 2007.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HAGERDAL, B.; JÖNSSON, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using

recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology,** v.31, n. 3, p. 274-282, 2002.

MODIG, T.; ALMEIDA, J.R.M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G. Variability of the response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to lignocellulose hydrolysate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 423-429, 2008.

NASCIMENTO, R. A. A. **Caracterização da lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: identificação dos compostos de degradação e reações envolvidas**. 2007. Tese (Doutorado). EEL, USP: Lorena, S.P., 2007.

NICHOLS, N.N; SHARMA, L.N; MOWERY, R. A.; CHAMBLISS, C. K; VAN WALSUM, G. P; BRUCE S. DIEN, B. S; ITEN, L. B. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 624–630, 2008.

PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N. Q.; HAHN-HAGERDAL, B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology and Bioengineering,** v.63, n. 1, p. 46-55, 1999.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO, V. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* – **Biotechnology Letters,** v.11, n. 4, p. 269-274, 1989.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Appl. Microbiol. Biotechnology**, v. 31, p. 547-550, 1989.

PROÁLCOOL – Aspectos econômicos (Portal eletrônico Biodiesel.com). Disponível em <http://www.biodieselbr.com/proalcool/proalcool-aspectos-economicos.htm> Acesso em 23.fev.2010.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme Microb Technol**, v.10, p. 315-318. 1988.

SILVA, F. T. **Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana**. 1995. Tese (Doutorado). Unicamp: Campinas, S.P., 1995.

TAHERZADEH, M. J.; LIDÉN, G.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C. The effects of pantothenate deficiency and acetate addition on anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae.* **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 2. p. 176-182, 1996.

TAHERZADEH, M.J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology Biotechnology,** v. 53, p. 701-708, 2000.

ULBRICHT, R.J.; NORTHUP, S.J.; THOMAS, J.A. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. **Fund Appl Toxicol.** v. 4, p. 843–853. 1984.

UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAM - UNDP. **Sustainable bioenergy:** a framework for decision makers. 2007. Disponível em: <http://www.un-energy.org/sites/default/files/share/une/susdev.biofuels.fao_.pdf> Acesso em: 26 dezembro 2013.

Apêndices

Apêndice A – Curvas de calibração

A.1 – Curvas de calibração para a leitura da concentração de células, em g.L^{-1}, para cada lote comprado da levedura de panificação, conforme procedimento descrito no item 4.1.5.1.

Curva 1 – Utilizada apenas para operfil inicial da levedura.

Concentração da solução-mãe = 19,2±0,4 g.L^{-1} (desvio = 2%)

Tabela A.1 – Diluições da solução-mãe, concentrações dessas soluções e leitura da absorbância, a 600 nm, para construção da curva de calibração 1.

Diluição	Concentração – C (g.L^{-1})	Abs – A (600 nm)
1:500	0,04	0,119
1:250	0,08	0,235
1:200	0,10	0,299
1,5:250	0,12	0,335
1,5:200	0,14	0,413
1:100	0,19	0,551
1,5:100	0,29	0,794

Curva de calibração 1: C = 0,3681 . A – 0,0072 R^2 = 0,9972

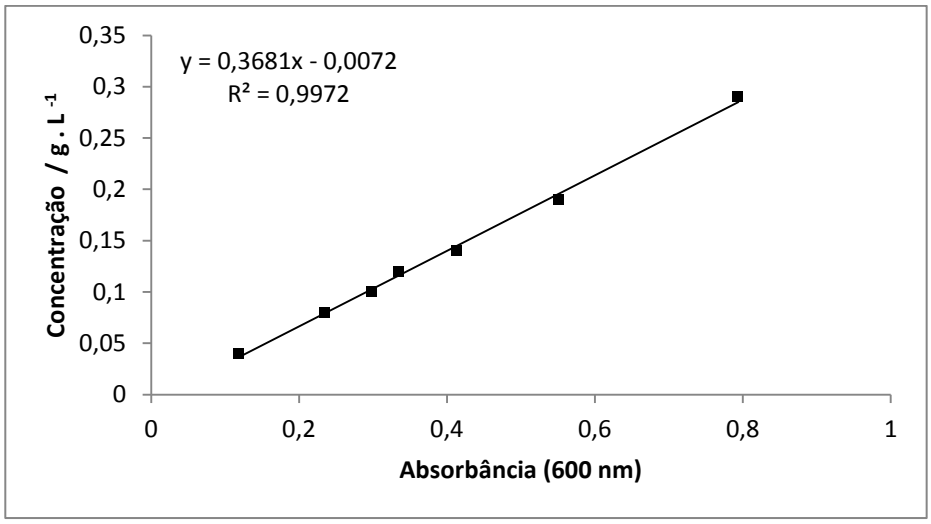


Figura A.1 – Curva de calibração para leitura das amostras do perfil inicial da levedura *S. cerevisiae* de panificação.

Curva 2 – Utilizada para os experimentos com os seguintes compostos e respectivos controles: p-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico e ácido ferúlico.

Concentração da solução-mãe = 19,70±0,02 $g.L^{-1}$ (desvio = 0,1%)

Tabela A.2 – Diluições da solução-mãe, concentrações dessas soluções e leitura da absorbância, a 600 nm, para construção da curva de calibração 2.

Diluição	Concentração – C ($g.L^{-1}$)	Abs – A (600 nm)
1:200	0,0985	0,335
1,5:200	0,1477	0,475
1:100	0,1970	0,613
1,5:100	0,2955	0,831
1:50	0,3940	1,012

Curva de calibração 2: C = 0,435 . A – 0,0576 R^2 = 0,9919

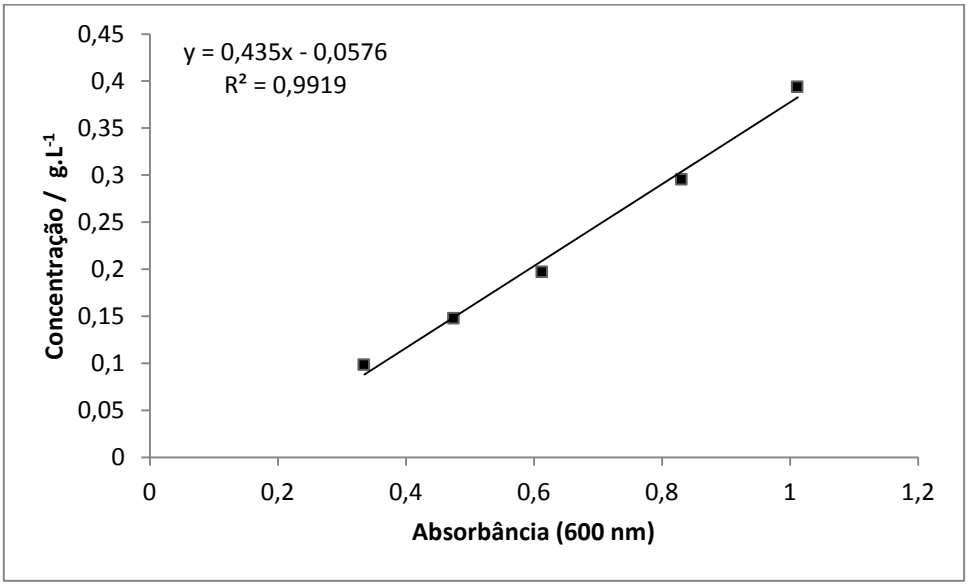


Figura A.2 – Curva de calibração para leitura das amostras de massa celular para os experimentos com os seguintes compostos e respectivos controles: *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico e ácido ferúlico, para a levedura *S. cerevisiae* de panificação.

Curva 3 – Utilizada para os experimentos com o ácido siríngico e respectivo controle.

Concentração da solução-mãe = 19,25±0,09 $g.L^{-1}$ (desvio = 0,5%)

Tabela A.3 – Diluições da solução-mãe, concentrações dessas soluções e leitura da absorbância, a 600 nm, para construção da curva de calibração 3.

Diluição	Concentração – C ($g.L^{-1}$)	Abs – A (600 nm)
1,25:200	0,1203	0,473
1,5:200	0,1444	0,559
1:100	0,1925	0,702
1,25:100	0,2406	0,832
1,5:100	0,2888	0,942
1,75:100	0,3369	1,068

Curva de calibração 3: C = 0,368 . A – 0,0601 R^2 = 0,9964

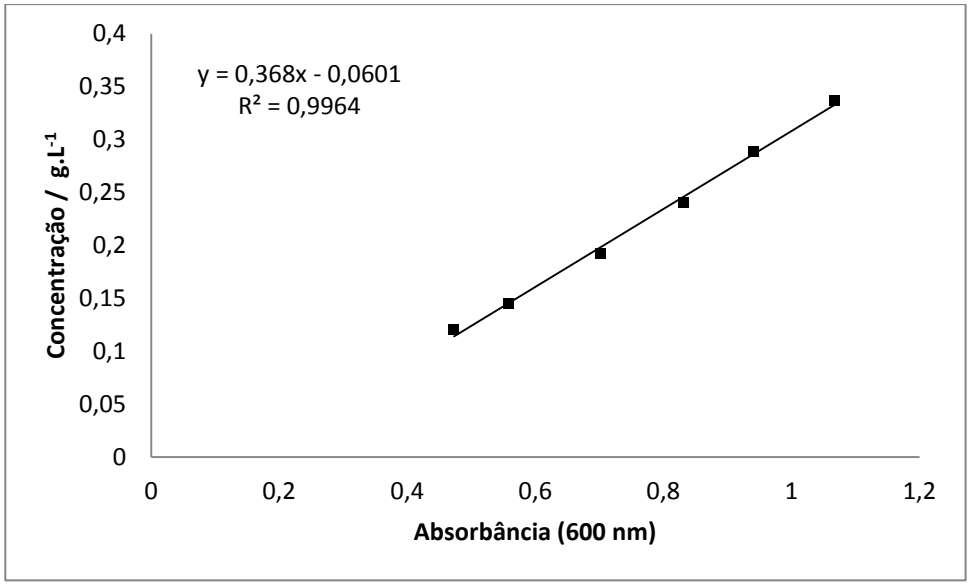


Figura A.3 – Curva de calibração para leitura das amostras de massa celular para os experimentos com ácido siríngico e respectivo controle, para a levedura *S. cerevisiae* de panificação.

Curva 4 – Utilizada para os experimentos com o ácido cumárico e respectivo controle.

Concentração da solução-mãe = 17,8±0,3 $g.L^{-1}$ (desvio = 1,7%)

Tabela A.4 – Diluições da solução-mãe, concentrações dessas soluções e leitura da absorbância, a 600 nm, para construção da curva de calibração 4.

Diluição	Concentração – C ($g.L^{-1}$)	Abs – A (600 nm)
1,5:200	0,1336	0,494
1:100	0,1781	0,646
1,25:100	0,2226	0,765
1,5:100	0,2671	0,890
1,75:100	0,3116	0,989

Curva de calibração 4: C = 0,3588 . A – 0,0489 R^2 = 0,9948

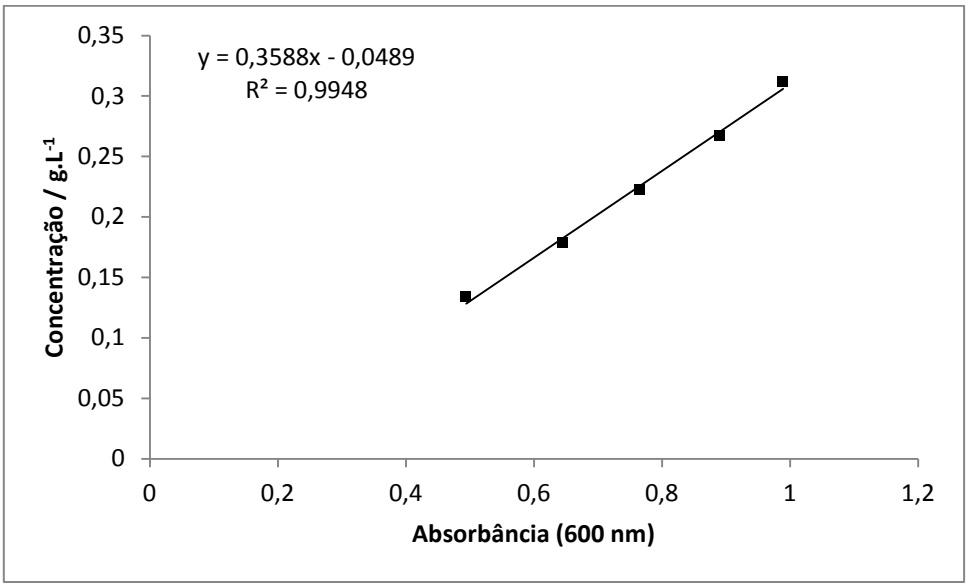


Figura A.4 – Curva de calibração para leitura das amostras de massa celular para os experimentos com ácido siríngico e respectivo controle, para a levedura *S. cerevisiae* de panificação.

A.2 – Curva de calibração para a leitura da concentração de células, em $g.L^{-1}$, para a levedura Saccharomyces cerevisiae PE-2.

Determinação da massa seca de levedura após a propagação.

Massa úmida após centrifugação em tubos tarados e descarte do sobrenadante (quadruplicata) = 0,57 ±0,04 g

Tabela A.5. Valores utilizados para o cálculo da biomassa seca, tanto da propagação quanto da solução-mãe.

pesa-filtros	inicial	final	diferença	Média e desvio	Finalidade da amostra
1	55,4419	55,5405	0,0986	0,0931±0,0049 em	Concentração
2	52,9996	53,0909	0,0913	10 mL	final da
3	55,5793	55,6687	0,0894	9,3±0,5 g/L	propagação
4	53,7129	53,7313	0,0184	0,0188±0,0006 em	Concentração da
5	53,7133	53,7318	0,0185	10 mL	soluça-mãe para
6	55,9151	55,9346	0,0195	1,88±0,06 g/L	DO

Logo: (0,0931 g seca / 0,57 g úmida) x100=16,3% de massa seca.

Determinação da curva de calibração

Tabela A.6 – Diluições da solução-mãe, concentrações dessas soluções e leitura da absorbância, a 600 nm, para construção da curva de calibração 5.

Diluição	Abs – A (600 nm)	Concentração ($g.L^{-1}$)
1:50	0,115	0,0376
1,25:50	0,143	0,0470
1,5:50	0,171	0,0564
1,75:50	0,200	0,0658
2:50	0,229	0,0752

Curva de calibração de massa celular para a S. cerevisiae PE-2:
c = 0,3298 . ABS – 0,0002 (R^2=0,9999)

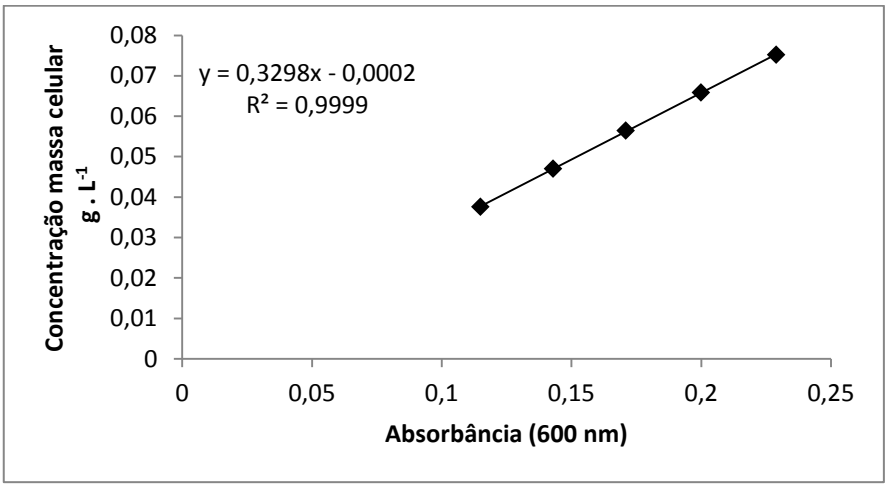


Figura A.5 – Curva de calibração para leitura das amostras de massa celular para os experimentos com a levedura *S. cerevisiae* PE-2.

A.3 – Curvas de calibração para a leitura da concentração de glicose, glicerol, ácido acético e etanol.

Equipamento utilizado para as leituras dos experimentos com a S. cerevisiae de panificação, conforme especificado no item 4.1.5.2.

Composto	Tempo de retenção (min)	Curva de calibração	R^2
Glicose	8,9	C = (Área + 4037,2) / 266442	0,9994
Glicerol	13,2	C = (área + 674,97) / 217914	0,9999
Ácido acético	15,1	C = (área + 604,99) / 141069	0,9997
Etanol	21,4	c = (9,0 x 10^{-6} x área) + 0,0048	0,9999

Equipamento utilizado para as leituras dos experimentos com a S. cerevisiae* PE-2*, conforme especificado no item 4.2.5.2.

Composto	Tempo de retenção (min)	Curva de calibração	R^2
Glicose	9,0	C = (Área + 138073,09) / 13650215,95	0,9999
Glicerol	13,3	C = (área + 160575,11) / 11653448,53	0,9999
Ácido acético	15,1	C = (área + 19011,31) / 6504534,2	0,9999
Etanol	21,4	c = (área + 61437,98) / 5471552,88	0,9999

A.4 – Curvas de calibração para a leitura da concentração dos compostos fenólicos, conforme especificado no item 4.2.5.4.

***p*-hidroxibenzaldeído** – Tempo de retenção = 8,8 min		
Faixa de linearidade (g . L^{-1})	Curva de calibração	R^2
0,000012 a 0,0012	C = (área + 1 x 10^6) / 9 x 10^{10}	0,999
0,0030 a 0,0152	C = (área - 1 x 10^8) / 3 x 10^{10}	0,9808

Siringaldeído – Tempo de retenção = 14,1 min		
Faixa de linearidade (g . L^{-1})	Curva de calibração	R^2
0,0012 a 0,0152	C = (área) / 2 x 10^{10}	0,99

Ácido *p*-hidroxibenzoico – Tempo de retenção = 6,0 min		
Faixa de linearidade (g . L^{-1})	Curva de calibração	R^2
0,0012 a 0,0073	C = (área) x 4 x 10^{-11}	0,9963
0,0049 a 0,0152	C = (área - 3 x 10^{7}) / 2 x 10^{10}	0,9749

Ácido vanílico – Tempo de retenção = 7,5 min		
Faixa de linearidade (g . L^{-1})	Curva de calibração	R^2
0,0012 a 0,0152	C = (área) / 5 x 10^{9}	0,9988

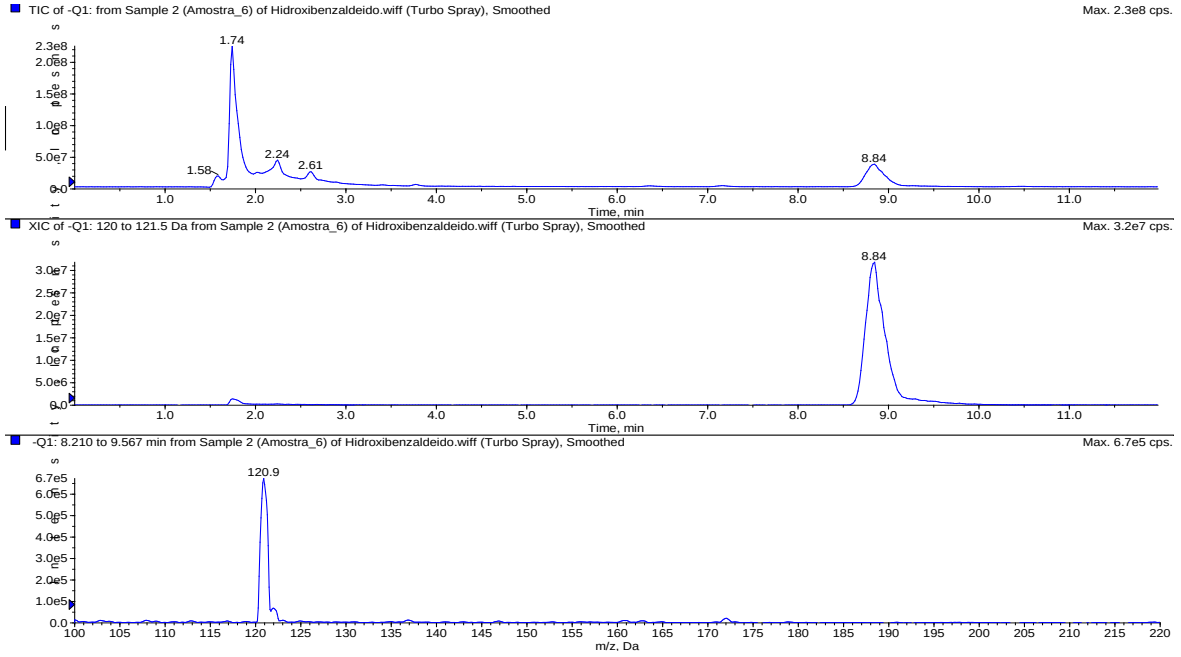
Ácido siríngico – Tempo de retenção = 8,2 min		
Faixa de linearidade (g . L^{-1})	Curva de calibração	R^2
0,0012 a 0,0150	C = (área) x 2 x 10^{-10}	0,9984

Ácido cumárico – Tempo de retenção = 14,0 min		
Faixa de linearidade (g.L^{-1})	Curva de calibração	R^2
0,0012 a 0,0072	C = (área - 1 x 10^{7}) / 3 x 10^{10}	0,997
0,0048 a 0,0150	C = (área - 4 x 10^{7}) / 2 x 10^{10}	0,9944

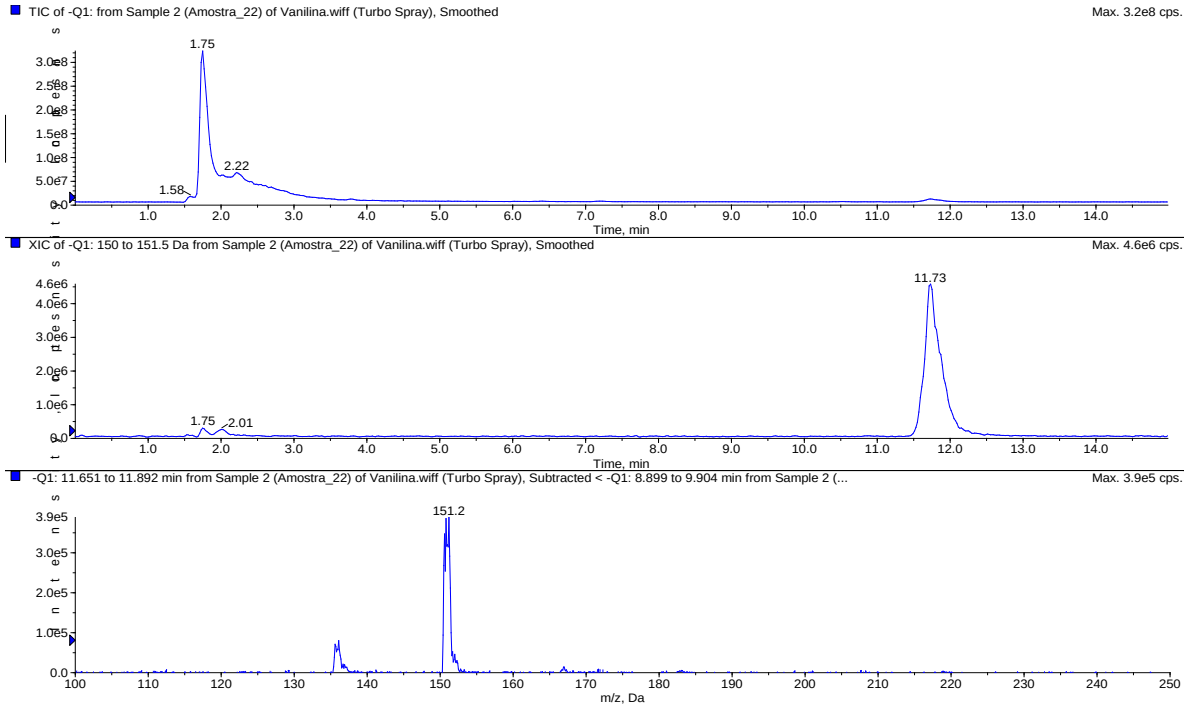
Ácido ferúlico – Tempo de retenção = 19,3 min		
Faixa de linearidade (g . L^{-1})	Curva de calibração	R^2
0,00012 a 0,0150	C = (área x 8 x 10^{-11}) – 3 x 10^{-5}	0,9995

Apêndice B – Cromatogramas de íons totais (TIC) e de íon extraído (XIC) para os compostos modelo, após 6 h nos ensaios realizados sem adição da levedura *S. cerevisiae* PE-2

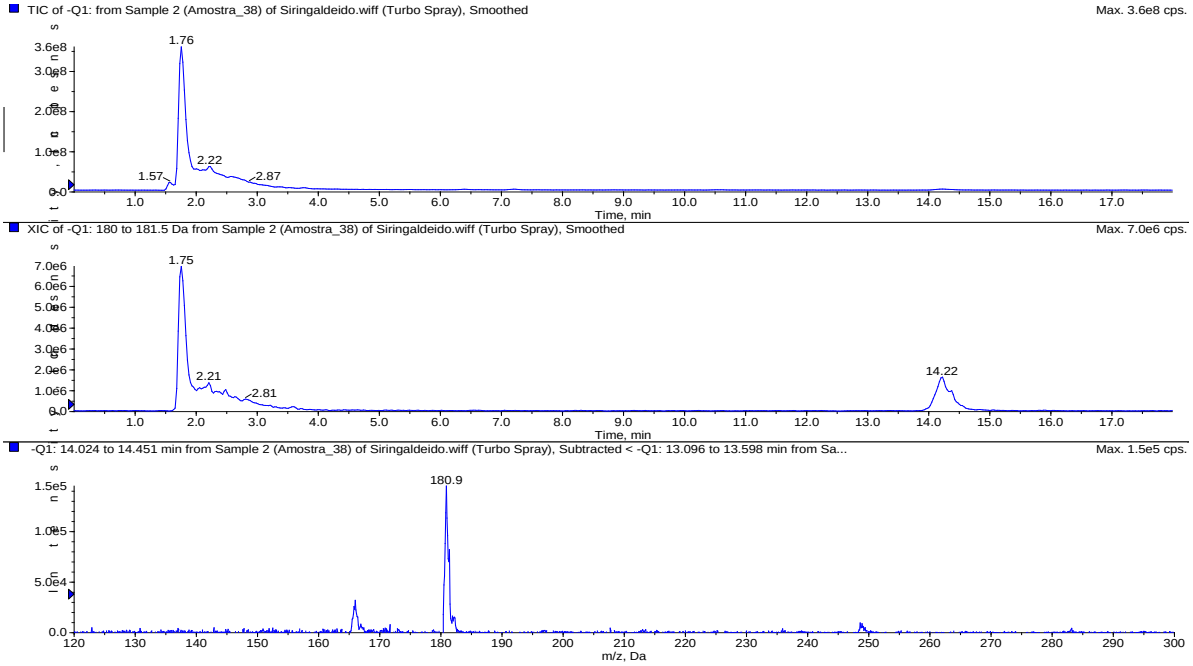
B.1 – Composto modelo p-hidroxibenzaldeído



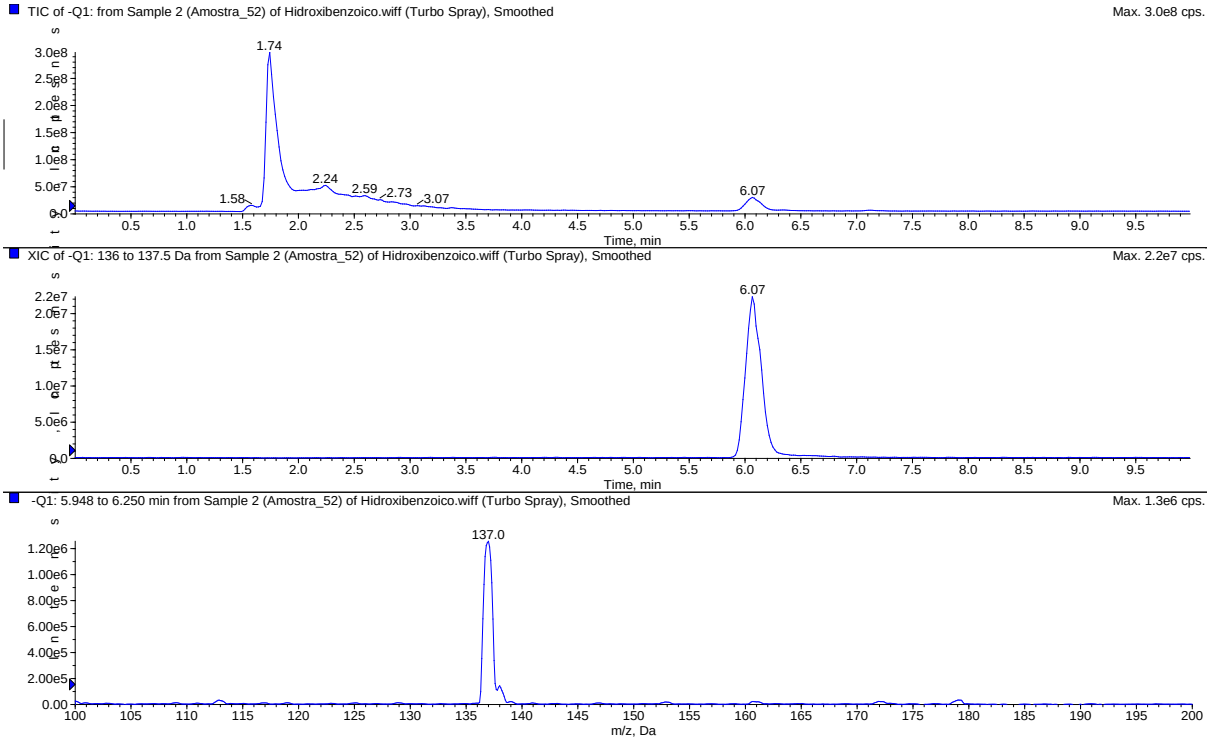
B.2 – Composto modelo vanilina



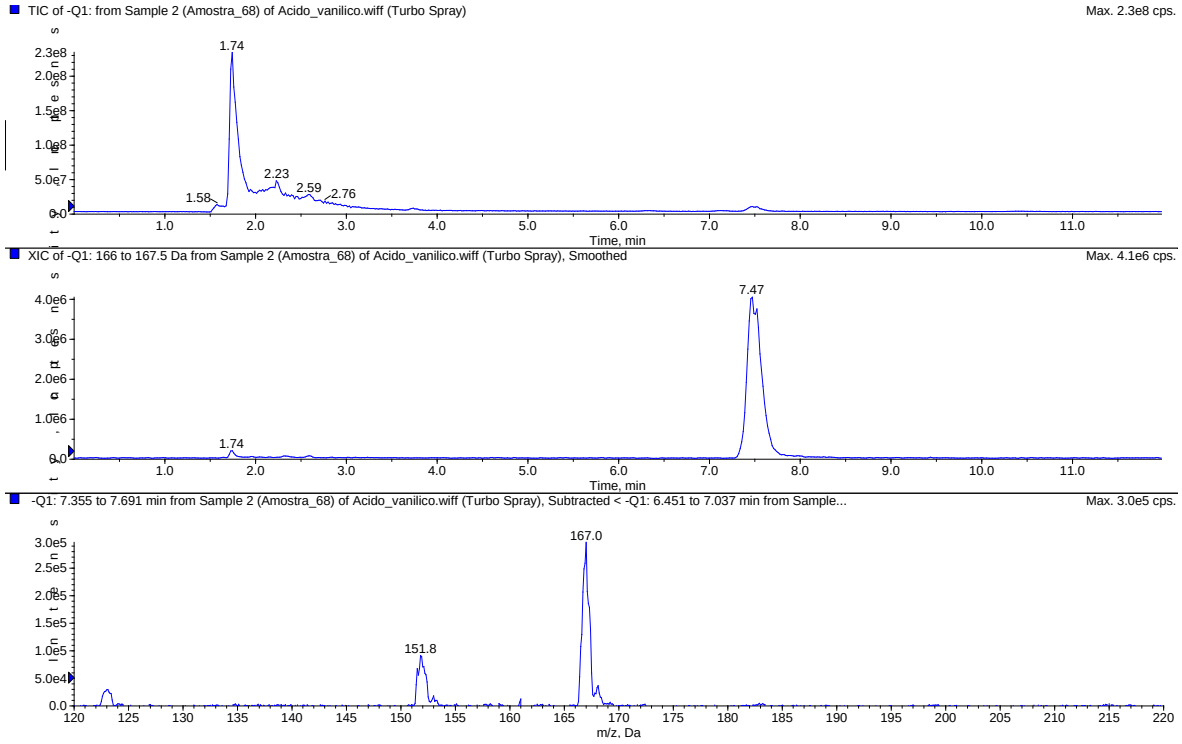
B.3 – Composto modelo siringaldeído



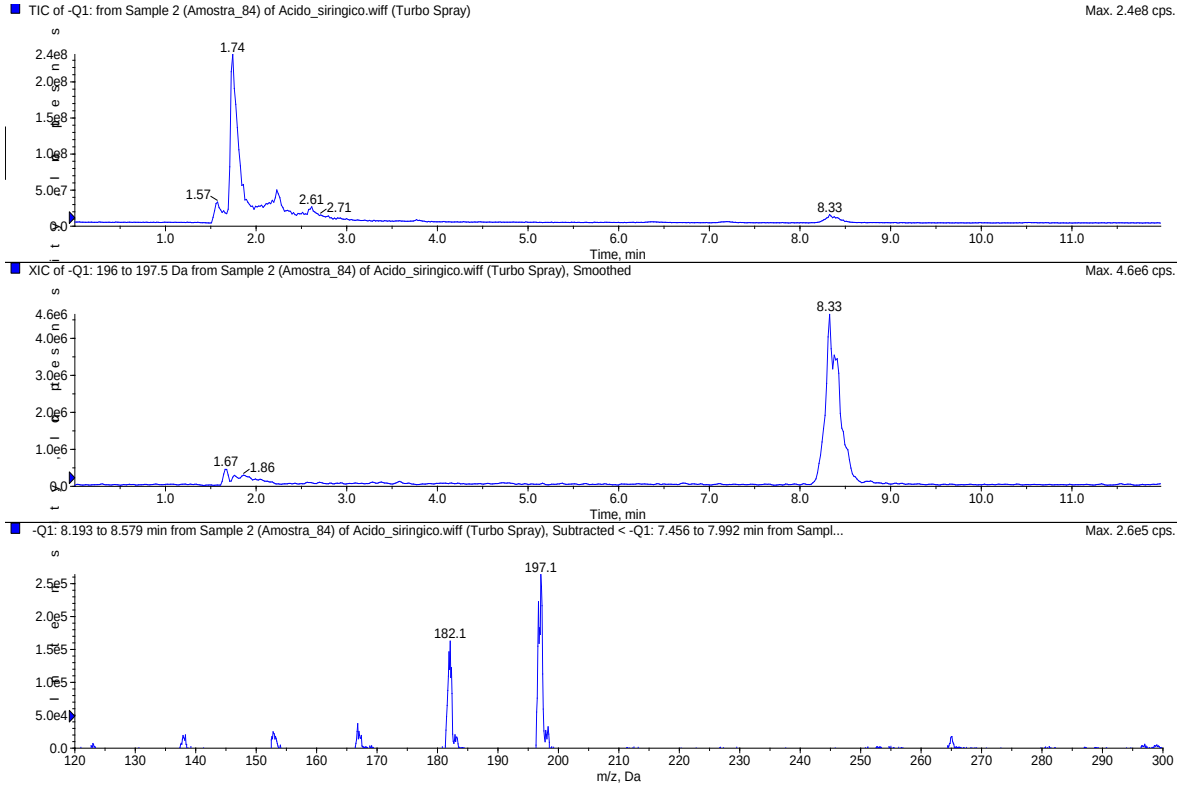
B.4 – Composto modelo ácido p-hidroxibenzoico



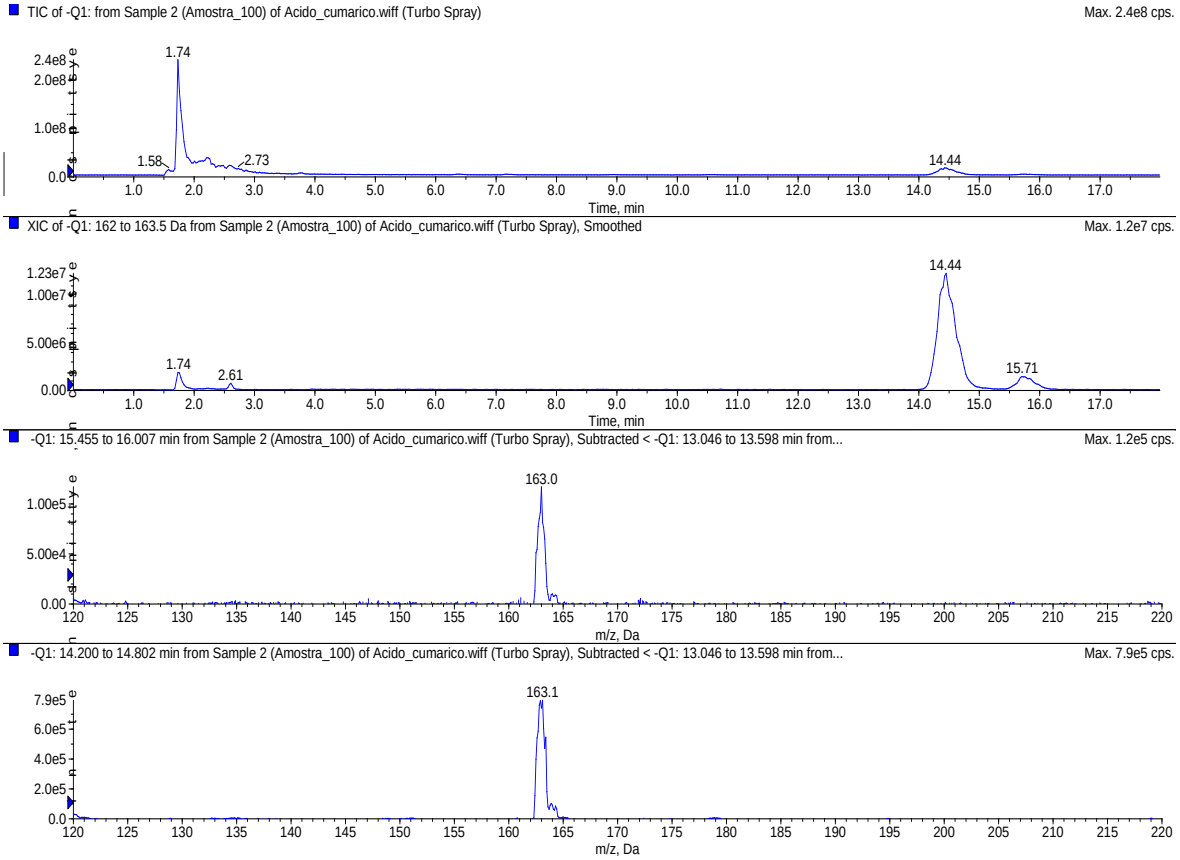
B.5 – Composto modelo ácido vanílico



B.6 – Composto modelo ácido siríngico

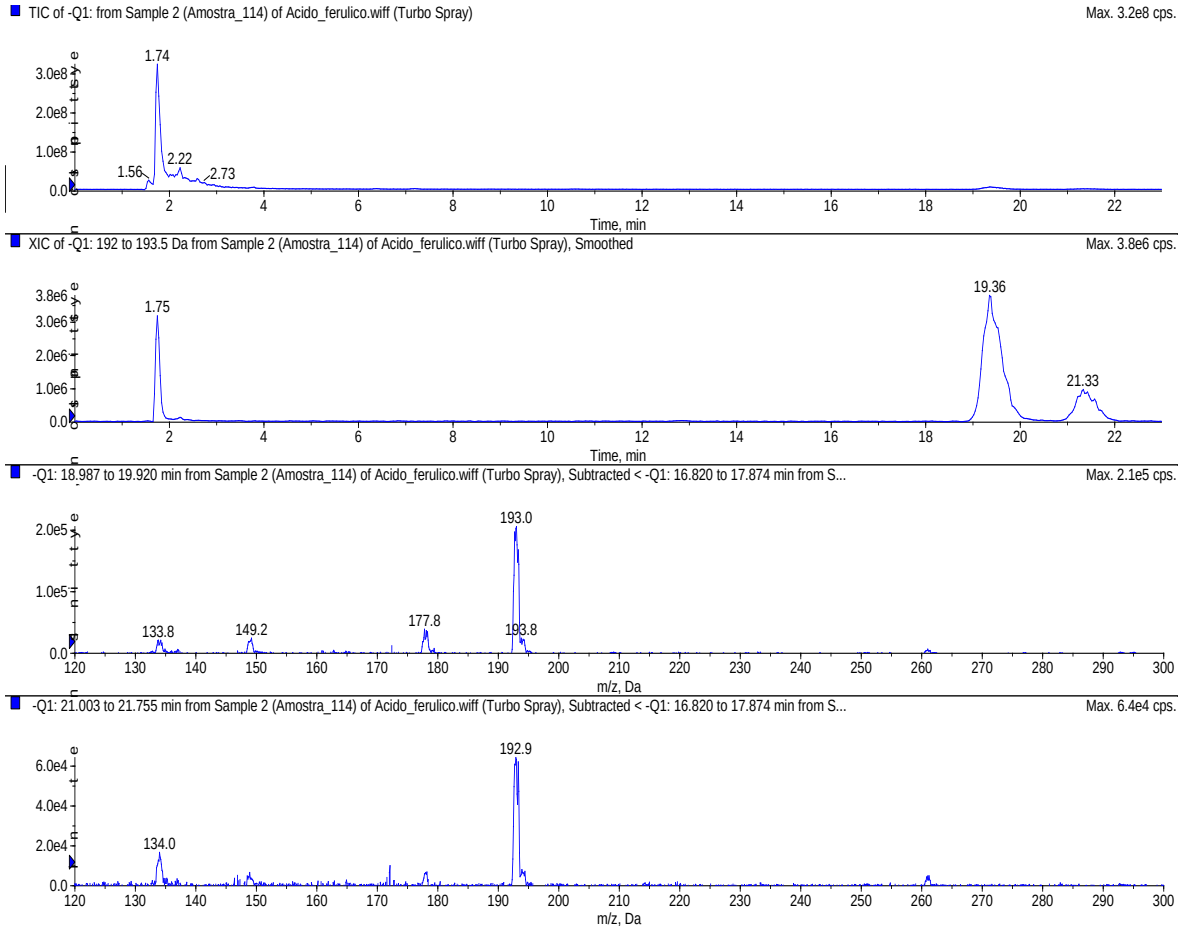


B.7 – Composto modelo ácido cumárico



Observação: o ácido cumárico apresentou dois picos consecutivos (14,4 e 15,7 min), que ao serem analisados, revelaram o mesmo *m/z*. Concluiu-se que esse composto estava presente na forma de seus isômeros *cis e trans.*

B.8 – Composto modelo ácido ferúlico



Observação: o ácido ferúlico apresentou dois picos consecutivos (19,36 e 21,33 min), que ao serem analisados, revelaram o mesmo *m/z*. Concluiu-se que esse composto estava presente na forma de seus isômeros *cis e trans.*

Apêndice C – Espectro de massas dos íons fragmento para os compostos modelo e para os produtos da biotransformação no meio fermentativo

C.1 – Composto modelo p-hidroxibenzaldeído

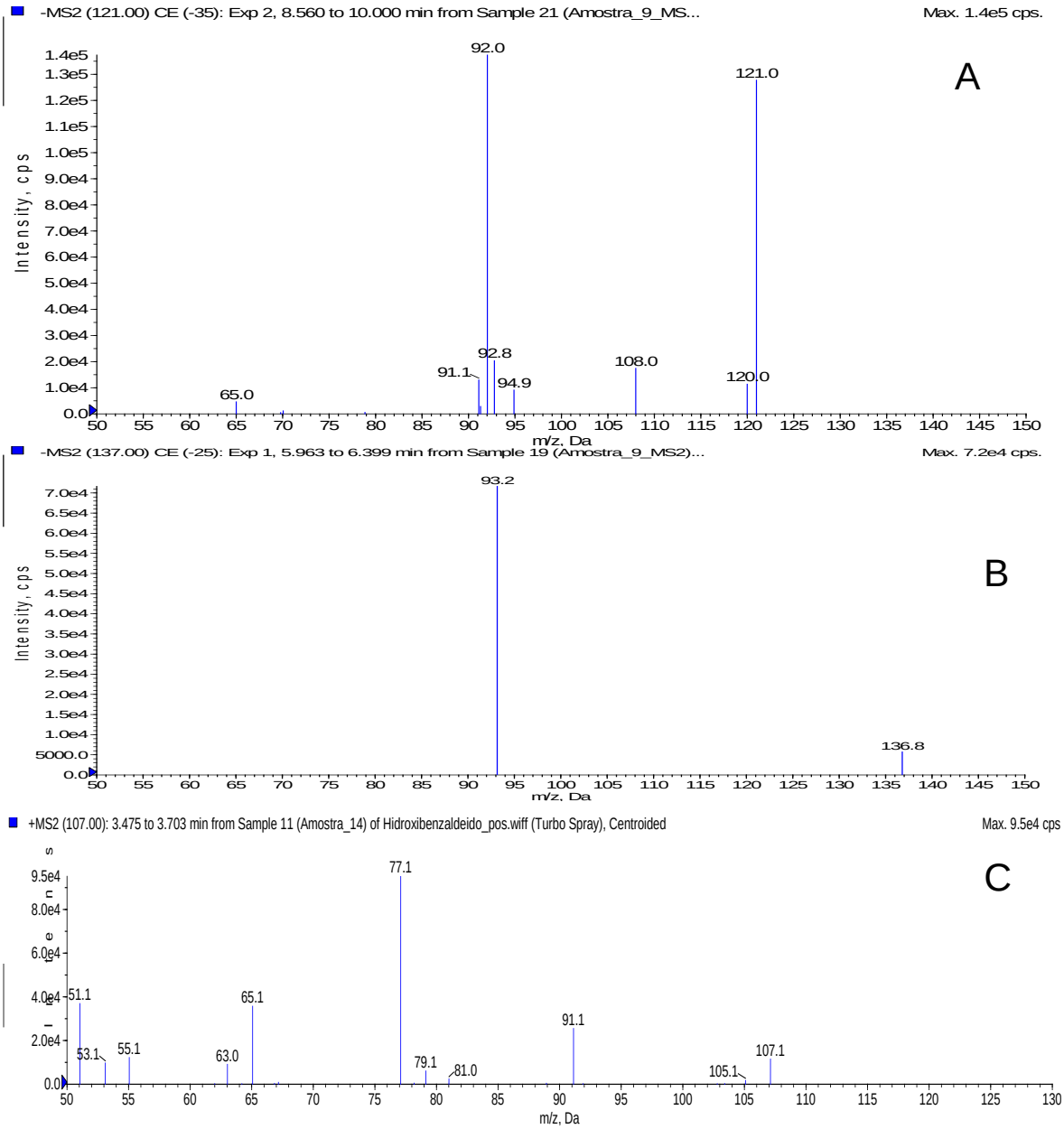


Figura C.1 – Espectro de massas para o *p*-hidrobenzaldeído (*m/z* 121,0) adicionado ao meio - A; seu produto de oxidação ácido *p*-hidroxibenzoico (*m/z* 136,8) – B; seu produto de redução álcool *p*-hidroxibenzílico, após eliminação de água e formação do carbocátion benzílico (*m/z* 107,1), lido no modo positivo de ionização.

C.2 – Composto modelo vanilina

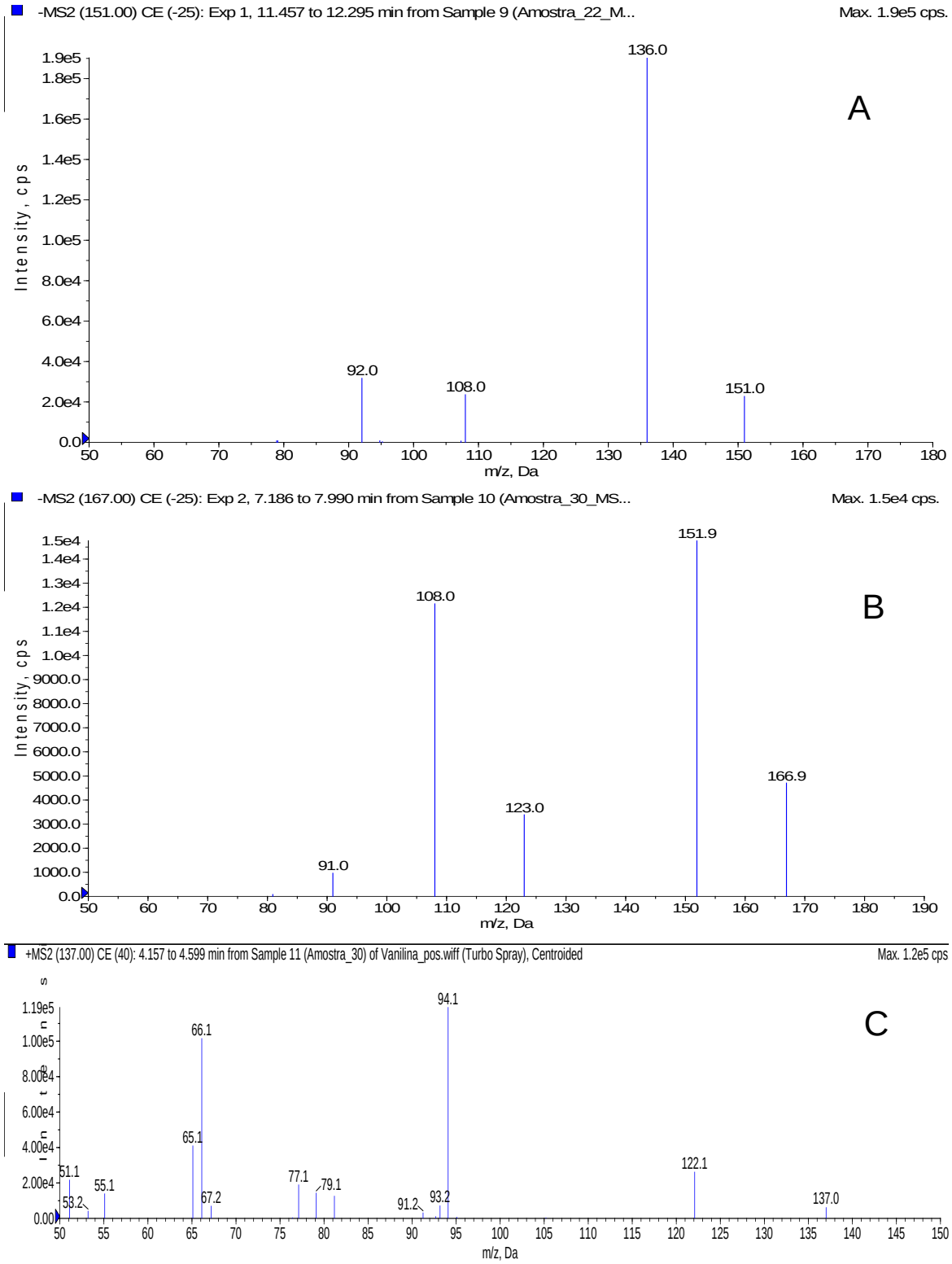


Figura C.2 - Espectro de massas para a vanilina (*m/z* 151), amostra controle sem levedura, tempo 6 h - **A**; seu produto de oxidação ácido vanílico (*m/z* 167), amostra de fermentação, tempo 6 h – **B**; seu produto de redução álcool vanílico, após perda de água para estabilização do íon (*m/z* 137), lido no modo positivo de ionização, amostra de fermentação, tempo 6 h - **C**.

C.3 – Composto modelo siringaldeído

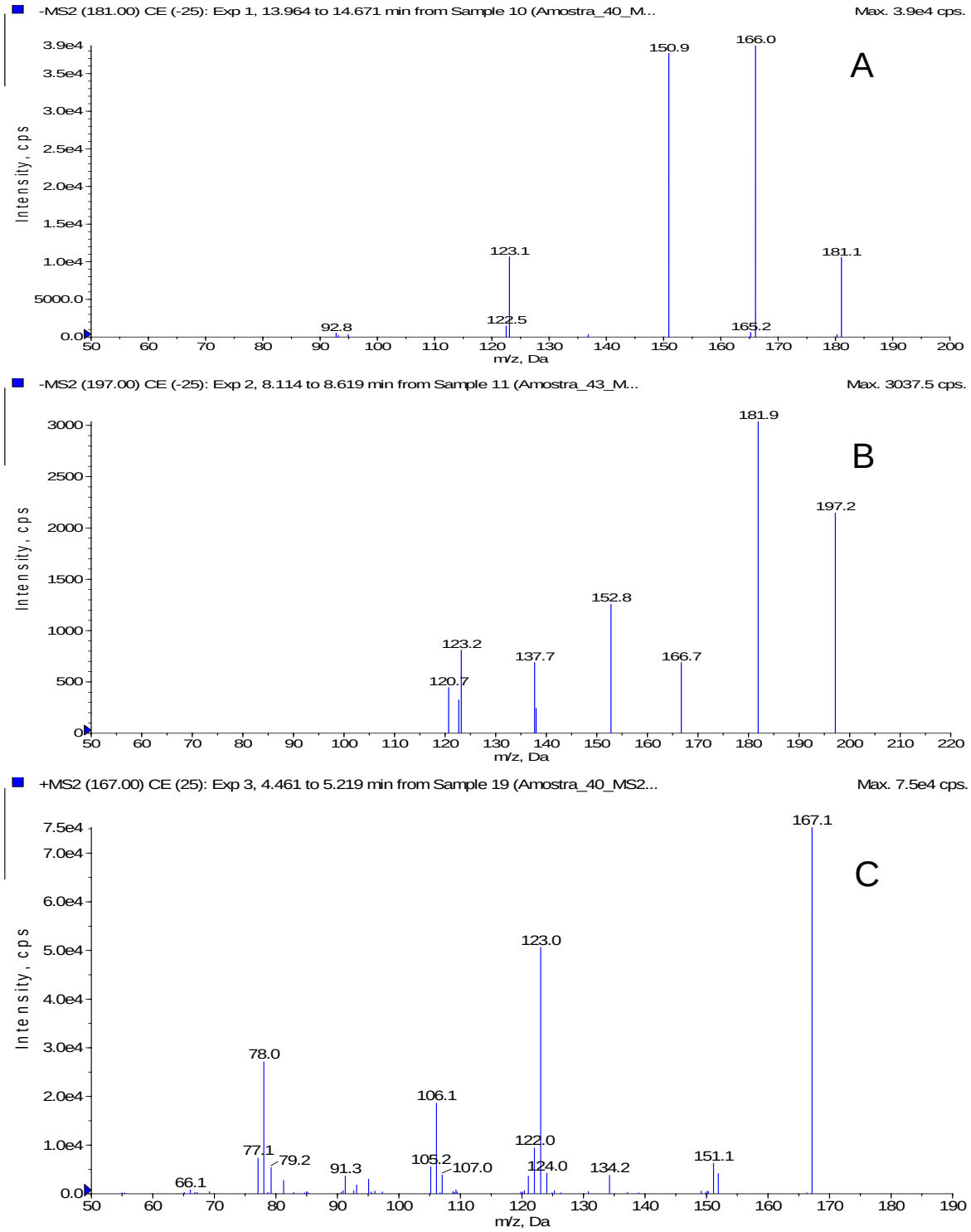


Figura C.3 - Espectro de massas para siringaldeído (*m/z* 181), amostra de fermentação, tempo 0 h - **A**; seu produto de oxidação ácido siríngico (*m/z* 197), amostra de fermentação, tempo 6 h – **B**; seu produto de redução álcool siringílico, após perda de água para estabilização do íon (*m/z* 167), lido no modo positivo de ionização, amostra de fermentação, tempo 0 h – **C.**

C.4 – Composto modelo ácido p-hidroxibenzoico

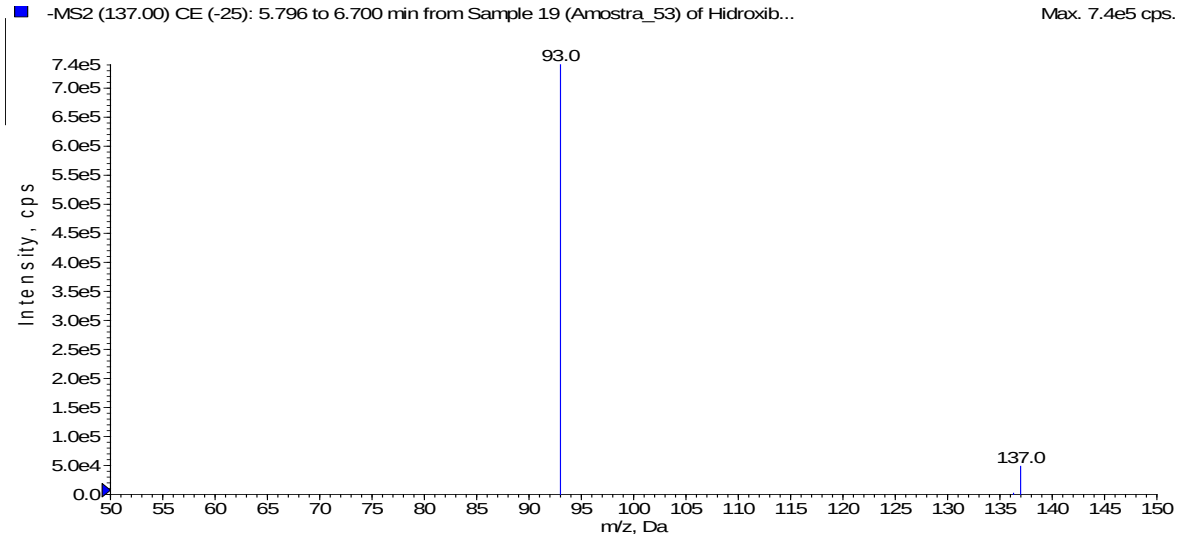


Figura C.4 - Espectro de massas para o ácido *p*-hidroxibenzoico (*m/z* 131), amostra de fermentação, tempo 0 h. Não foram encontrados produtos de biotransformação.

C.5 – Composto modelo ácido vanílico

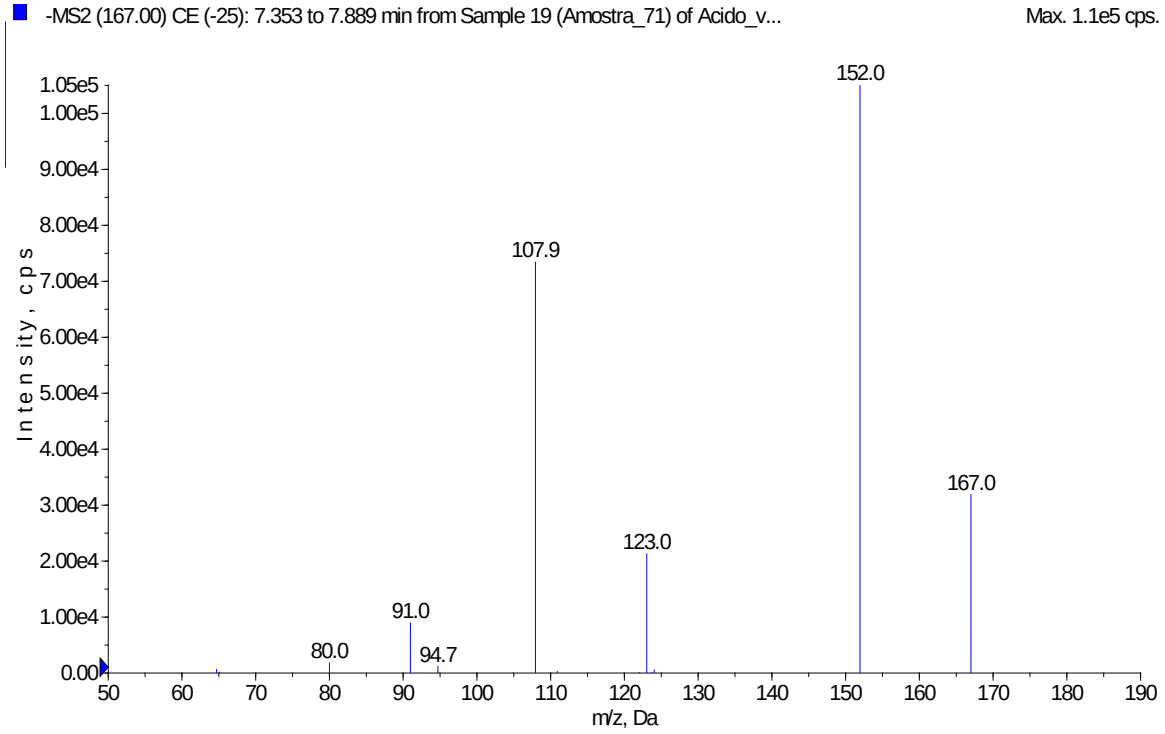


Figura C.5 - Espectro de massas para o ácido vanílico (*m/z* 167), amostra de fermentação, tempo 0 h. Não foram encontrados produtos de biotransformação.

C.6 – Composto modelo ácido siríngico

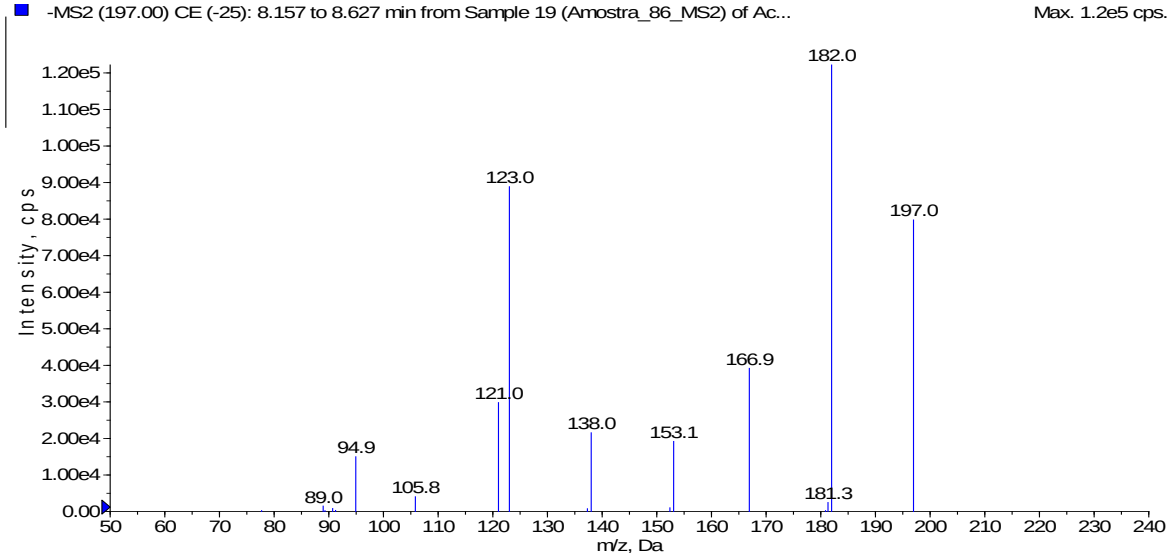


Figura C.6 - Espectro de massas para o ácido siríngico (*m/z* 197), amostra de fermentação, tempo 0 h. Não foram encontrados produtos de biotransformação.

C.7 – Composto modelo ácido cumárico

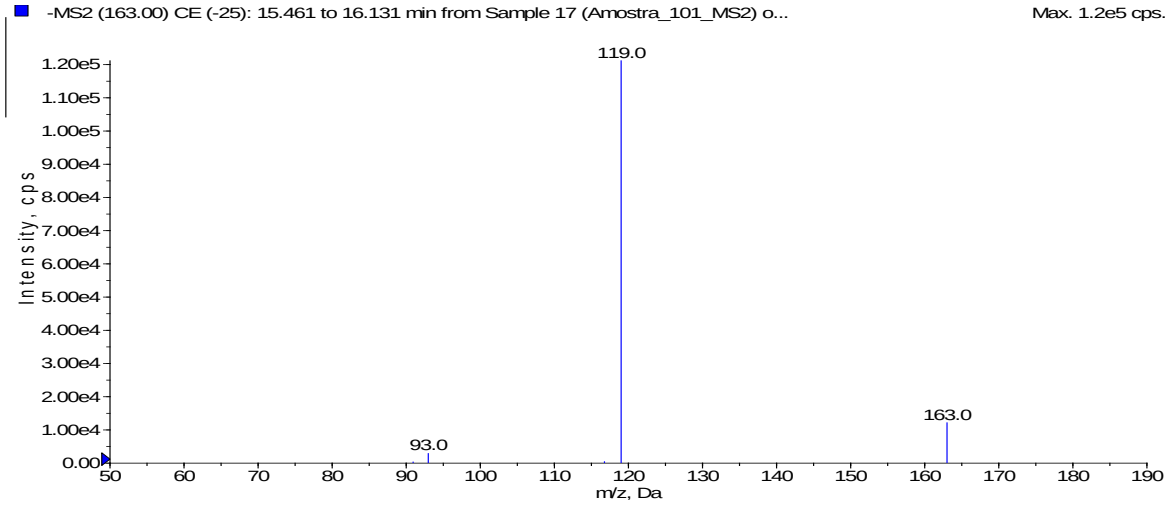


Figura C.7 - Espectro de massas para o ácido cumárico (*m/z* 163), amostra de fermentação, tempo 0 h. Não foram encontrados produtos de biotransformação.

C.8 – Composto modelo ácido ferúlico

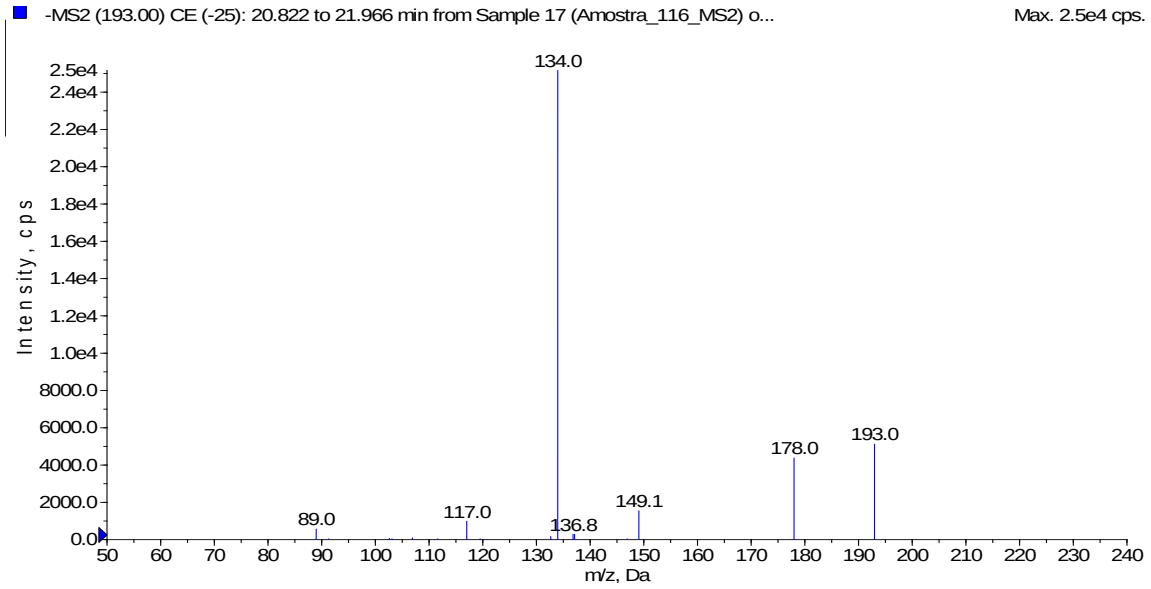


Figura C.8 - Espectro de massas para o ácido ferúlico (*m/z* 193), amostra de fermentação, tempo 0 h. Não foram encontrados produtos de biotransformação.