UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ISABELA ALVES DE MELO ZEFERINO

**Identificação de compostos inibidores presentes nos hidrolisados
hemicelulósicos de biomassa vegetal e seus efeitos sobre a produção de
etanol por *Pichia stipitis***

Lorena
2013

ISABELA ALVES DE MELO ZEFERINO

**Identificação de compostos inibidores presentes nos hidrolisados
hemicelulósicos de biomassa vegetal e seus efeitos sobre a produção de
etanol por *Pichia stipitis***

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Inês Conceição Roberto

Versão Original

LORENA
2013

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.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Zeferino, Isabela Alves de Melo

Identificação de compostos inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal e seus efeitos sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis* / Isabela Alves de Melo Zeferino. – 2013.

218 p.: il.

Dissertação (Mestre 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. 2013.

Orientadora: Inês Conceição Roberto

1. Inibidores 2. Hidrolisado hemicelulósico 3. Fermentação 4. *Pichia stipitis*.
I. Título. II. Roberto, Inês Conceição, orient.

662.636 - CDU

**Dedico este trabalho a toda minha
família, especialmente aos meus pais
Dora e Regino, por todo apoio.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus. Por tudo, por me permitir alcançar mais esta conquista.

A toda minha família, principalmente meus pais, Dora e Regino, por sempre me apoiarem nos momentos de dificuldade, e meus irmãos Gabriela, Sarah e Arthur. Tios, primos, padrinhos, vó, obrigada por torcerem por mim e estarem ao meu lado!

À professora Dra. Inês Conceição Roberto, pela orientação, paciência, confiança e por todo o aprendizado que me proporcionou neste trabalho.

Aos meus queridos colegas de laboratório, Dani Cortez, Guedes, João Paulo, Rafael, Tathi, Tanus, Dani Garcia, Lívia, Túlio, Isabela e Bárbara, por compartilharem dos momentos bons e ruins e tornarem esta jornada muitas vezes mais fácil, divertida e até engraçada! Especialmente aos amigos Dani Cortez, João Paulo e Bruno Guedes, sem os quais a realização deste trabalho teria sido muito mais difícil.

A todos os colegas do Departamento de Biotecnologia, pelos momentos divertidos que passamos juntos. Um agradecimento especial para Felipe e Omar, que fizeram da sua casa a minha casa.

Aos amigos de Contagem e Viçosa que, mesmo distantes, foram muito presentes.

À USP, seus professores e demais funcionários, pela oportunidade, aprendizado e suporte durante este período.

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

ZEFERINO, I. A. M. Identificação de compostos inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal e seus efeitos sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis*. 2013. 218p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2013.

O presente estudo teve como objetivo identificar os principais compostos inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (HHPA) e bagaço de malte (HHBM), assim como avaliar o perfil fermentativo de *Pichia stipitis* em meio semissintético contendo os compostos previamente identificados. Foi também objetivo do trabalho avaliar a fermentação da levedura em HHPA e HHBM não destoxificados, de forma a se obter informações sobre o grau de toxicidade destes meios. Após identificação dos inibidores, incluindo ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural, vanilina, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, foram realizados ensaios fermentativos em meio semissintético variando-se a concentração de cada composto. Os resultados mostraram que, para todos os níveis de ácido acético avaliados (1,5 a 4,5 g.L⁻¹), o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) foi menos afetado do que a produtividade volumétrica em etanol (Q_P), sendo que para os meios contendo o maior nível deste ácido os valores de $Y_{P/S}$ e Q_P foram reduzidos em 25 e 77%, respectivamente, em relação ao controle. Dentre os furanos (furfural, de 12 a 84 mg.L⁻¹ e hidroximetilfurfural, de 218 a 553 mg.L⁻¹), o hidroximetilfurfural na concentração de 553 mg.L⁻¹ foi o que apresentou a maior redução nos valores de $Y_{P/S}$ (~30%) e Q_P (~50%) em relação ao controle. Para os fenólicos (vanilina, siringaldeído, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico), o maior impacto sobre o metabolismo fermentativo de *P. stipitis* foi observado com o siringaldeído visto que, em todos os níveis avaliados (90 a 620 mg.L⁻¹), os parâmetros fermentativos foram afetados. Os resultados também demonstraram que, com exceção do ácido *p*-cumárico, a levedura foi capaz de assimilar todos os inibidores presentes no meio e que o perfil de assimilação variou com o tipo e concentração do composto. A vanilina e os furanos foram completamente assimilados em todos os níveis estudados, enquanto que o ácido acético foi totalmente assimilado pela levedura apenas na menor concentração. Nas fermentações realizadas em HHPA e HHBM não destoxificados, os resultados mostraram que a produção de etanol foi similar ao meio semissintético sem inibidores, porém em tempos mais elevados. Além disso, em HHBM o valor de $Y_{P/S}$ foi ligeiramente superior (~10%) ao observado no HHPA, o que pode ser atribuído às variações na composição nutricional de cada hidrolisado. O perfil fermentativo da levedura em ambos os hidrolisados mostrou uma cinética mais lenta quando comparado aos meios semissintéticos mimetizando a composição destes, o que sugere a existência de outras substâncias tóxicas nos hidrolisados além das avaliadas neste estudo. Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que, dentre os inibidores identificados nos hidrolisados, o ácido acético foi o composto de maior potencial inibitório, seguido pelos furanos e fenólicos, sendo o efeito destes compostos mais pronunciado na produtividade volumétrica em etanol do que no fator de conversão de substrato em etanol. Estas informações são de fundamental importância na elaboração de estratégias de destoxificação e/ou condução do processo visando à melhoria da fermentação em hidrolisados.

Palavras-chave: Inibidores. Hidrolisado hemicelulósico. Fermentação. *Pichia stipitis*

ABSTRACT

ZEFERINO, I. A. M. **Identification of inhibitory compounds present in plant biomass hemicellulosic hydrolysates and their effects on ethanol production by *Pichia stipitis***. 2013. 218p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2013.

The aim of this study was to identify the major inhibitory compounds present in rice straw hemicellulose hydrolysate (RSHH) and brewer's spent grain hemicellulose hydrolysate (BSGHH), as well as evaluate *Pichia stipitis* fermentation profile in semi-synthetic medium containing the previously identified compounds. It was also purpose of this study to evaluate the fermentation of RSHH and BSGHH without detoxification, in order to obtain information about the degree of toxicity of these media. After inhibitors identification, including acetic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural, vanillin, ferulic acid and *p*-coumaric acid, fermentation assays were carried out on semi-synthetic medium by varying the concentration of each compound. The results showed that, for all evaluated levels of acetic acid (from 1.5 to 4.5 g.L⁻¹), the ethanol yield ($Y_{P/S}$) was less affected than the ethanol volumetric productivity (Q_P), and for the media containing the higher evaluated level, the values of $Y_{P/S}$ and Q_P were reduced by 25 and 77%, respectively, compared to control. Among furans (furfural, from 12 to 84 mg.L⁻¹ and hydroxymethylfurfural, from 218 to 553 mg.L⁻¹), the hydroxymethylfurfural at 553 mg.L⁻¹ showed the highest reduction in $Y_{P/S}$ (~30%) and Q_P (~50%) compared to control. For the phenolic compounds (vanillin, syringaldehyde, ferulic acid and *p*-coumaric acid), the greatest impact on the *Pichia stipitis* fermentative metabolism was observed with syringaldehyde since the fermentative parameters were affected at all evaluated levels (from 90 to 620 mg.L⁻¹). The results also showed that, except for the *p*-coumaric acid, the yeast was able to assimilate all inhibitory compounds in the medium and that the assimilation profile varied with the type and concentration of these compounds. Vanillin and furans were completely assimilated at all studied levels, whereas acetic acid was completely assimilated only at the lowest concentration. The ethanol production in RSHH and BSGHH was similar to that observed in semi-synthetic medium without inhibitors, but in a longer period of time. In addition, the $Y_{P/S}$ value obtained in BSGHH was slightly higher (~10%) than that observed in RSHH, which can be attributed to variations in the nutritional composition of each hydrolysate. The yeast fermentation profile in both hydrolysates showed slower kinetics when compared to semi-synthetic medium containing the same inhibitors, which suggests the existence of other toxic substances in the hydrolysate in addition to those evaluated in this study. Based on the results obtained in this study, it can be concluded that, among the inhibitors identified in hydrolysates, acetic acid was the main inhibitory compound, followed by furans and phenolics. The most pronounced effect of these compounds was in ethanol volumetric productivity rather than in the ethanol yield. This information is of fundamental importance in the development of detoxification and/or process conduction strategies aimed at improving the fermentation in hemicellulosic hydrolysates.

Key-words: Inhibitors. Hemicellulosic hydrolysates. Fermentation. *Pichia stipitis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Esquema classificatório das diferentes fontes de biomassas.	30
Figura 2.2 – Representação esquemática da estrutura química parcial de O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana de dicotiledôneas (PULS; SCHUSEIL, 1993).	31
Figura 2.3 – Representação esquemática da estrutura química parcial de arabino-4-O-metilglucuronoxilana de gimnospermas (PULS; SCHUSEIL, 1993).	32
Figura 2.4 - Representação esquemática da estrutura química parcial de xilana de gramíneas, com ácido ferúlico (ou ácido p-cumárico) ligados ao O-5 da cadeia lateral de arabinofuranosil (PULS; SCHUSEIL, 1993).	33
Figura 2.5 - Unidades de fenilpropano precursoras da macromolécula de lignina (FENGEL; WEGENER, 1984).	34
Figura 2.6 - Mapa da produção agrícola de arroz no Estado de São Paulo na safra 2007/2008 (SÃO PAULO, 2008).	37
Figura 2.7 - Mecanismo de hidrólise ácida de ligações glicosídicas (FENGEL; WEGENER, 1984).	40
Figura 2.8 - Principais mecanismos envolvidos na etapa de conversão de xilose em xilulose para síntese de etanol por micro-organismos, (a) em bactérias, (b) em fungos e leveduras em geral e (c) em <i>Pichia stipitis</i> . (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).	42
Figura 2.9 - Esquema das vias metabólicas pelas quais ocorre a conversão de xilose (via das pentoses fosfatadas) e glicose (via glicolítica) a etanol (Adaptado de MATSUSHIKA et al., 2009).	42
Figura 2.10 – Representação da molécula de ácido acético, $MM=60,05 \text{ g.mol}^{-1}$ (MERCK, 1983).	49
Figura 2.11 - Atuação do ácido acético como inibidor no interior da célula de micro-organismos. (Adaptado de LAWFORD; ROUSSEAU, 1993; MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).	51
Figura 2.12 - Formação de furfural, hidroximetilfurfural, ácido levulínico e ácido fórmico a partir de monossacarídeos em meio ácido. Adaptado de Fengel e Wegener (1984) e Palmqvist e Hahn-Hagerdal (2000).	53
Figura 2.13 - Ação dos compostos furanos como inibidores nas células de micro-organismos (Adaptado de MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).	54
Figura 2.14 - Diagrama esquemático demonstrando a redução de furfural a 2-furanometanol mediada por redutases (a), bem como a conversão de HMF em furano-2,5-dimetanol (b) (LIU et al., 2004; MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).	56
Figura 2.15 - 2-furaldeído, 2-furancarbaldeído, Furfural, $MM = 96,08 \text{ g.mol}^{-1}$ (MERCK, 1983).	56

Figura 2.16 - 5-(Hidroximetil)-2-furaldeído, 5-(hidroximetil)-furano-2-carboxaldeído, 5-(hidroximetil)-2-furfural, HMF, MM=126,11 g.mol ⁻¹ (MERCK, 1983).....	58
Figura 2.17 - Principais alvos dos compostos fenólicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos de biomassas vegetais nas células de micro-organismos (Adaptado de MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).....	62
Figura 2.18 – Vanilina, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (MERCK, 1983).....	62
Figura 2.19 – Siringaldeído, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído (MERCK, 1983).	65
Figura 2.20 – Ácido ferúlico, ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenóico, ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (MERCK, 1983).....	66
Figura 2.21 - Ácido p-cumárico, ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenóico, ácido p-hidroxicinâmico MM=164,15 g.mol ⁻¹ (MERCK, 1983).....	67
Figura 5.1- Curva de calibração de absorbância a 600 nm em função da concentração celular obtida por regressão linear dos dados experimentais, para meio semissintético. Na imagem, os dados experimentais são representados por (■) e a regressão linear dos dados por (—).	89
Figura 5.2 - Curvas de calibração de absorbância a 600 nm em função da concentração celular obtida por regressão linear dos dados experimentais, para hidrolisado de palha de arroz (A) e hidrolisado de bagaço de malte (B). Nas imagens, os dados experimentais são representados por (■) e a regressão linear dos dados por (—).	90
Figura 5.3 - Perfil cromatográfico obtido pela análise de compostos furanos e fenólicos utilizando a coluna ZORBAX Eclipse Plus C18, conforme condições descritas no item 4.1.2.....	91
Figura 5.4 - Perfil cromatográfico obtido pela análise de: (A) ácido p- cumárico, (B) siringaldeído (C) ácido p-cumárico + siringaldeído, utilizando a coluna ZORBAX Eclipse Plus C18, conforme condições descritas no item 4.1.2.3.....	93
Figura 5.5 - Perfil cromatográfico obtido pela análise de compostos furanos e fenólicos utilizando a coluna Waters Spherisorb ODS2, conforme condições descritas no item 4.1.2.....	94
Figura 5.6 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por <i>Pichia stipitis</i> em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido acético em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem ácido acético (—■—), 1,5 g.L ⁻¹ (—●—), 2,0 g.L ⁻¹ (—▲—), 2,5 g.L ⁻¹ (—▼—), 3,5 g.L ⁻¹ (—◆—) e 4,5 g.L ⁻¹ (—►—) de ácido acético.....	102
Figura 5.7 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por <i>Pichia stipitis</i> em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido acético em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem ácido acético (—■—), 1,5 g.L ⁻¹ (—●—), 2,0 g.L ⁻¹ (—▲—), 2,5 g.L ⁻¹ (—▼—), 3,5 g.L ⁻¹ (—◆—) e 4,5 g.L ⁻¹ (—►—) de ácido acético.....	104

Figura 5.8 - Cinética de consumo de ácido acético (A) e taxas instantâneas de consumo de ácido acético (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido acético em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 1,5 g.L⁻¹ (—●—), 2,0 g.L⁻¹ (—▲—), 2,5 g.L⁻¹ (—▼—), 3,5 g.L⁻¹ (—◆—) e 4,5 g.L⁻¹ (—▶—) de ácido acético..... 108

Figura 5.9 - Regressão linear dos dados de cinética de consumo de ácido acético por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido acético em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 1,5 g.L⁻¹ (—●—), 2,0 g.L⁻¹ (—▲—), 2,5 g.L⁻¹ (—▼—), 3,5 g.L⁻¹ (—◆—) e 4,5 g.L⁻¹ (—▶—) de ácido acético. 109

Figura 5.10 - Efeito do ácido acético relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—⊗—). 111

Figura 5.11 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de furfural em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem furfural (—■—), 12 mg.L⁻¹ (—●—), 20 mg.L⁻¹ (—▲—), 43 mg.L⁻¹ (—▼—), 64 mg.L⁻¹ (—◆—) e 84 mg.L⁻¹ (—▶—) de furfural. 115

Figura 5.12 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de furfural em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem furfural (—■—), 12 mg.L⁻¹ (—●—), 20 mg.L⁻¹ (—▲—), 43 mg.L⁻¹ (—▼—), 64 mg.L⁻¹ (—◆—) e 84 mg.L⁻¹ (—▶—) de furfural. 118

Figura 5.13 - Cinética de consumo de furfural por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de furfural em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 12 mg.L⁻¹ (—●—), 20 mg.L⁻¹ (—▲—), 43 mg.L⁻¹ (—▼—), 64 mg.L⁻¹ (—◆—) e 84 mg.L⁻¹ (—▶—) de furfural. 120

Figura 5.14 - Efeito do furfural relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—⊗—). 123

Figura 5.15 - Representação esquemática do efeito da presença de furfural sobre a atividade metabólica de leveduras bem como sua bioconversão. Na imagem, as setas vermelhas representam as vias mais fortemente afetadas pela presença do inibidor e as setas verdes representam aquelas que são menos afetadas. ADH: álcool desidrogenase, AIDH: aldeído desidrogenase, PDH: piruvato desidrogenase (Adaptado de Modig, Lidén e Taherzadeh, 2002) 125

Figura 5.16 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de 5-HMF em diferentes concentrações iniciais. As cores

representam: controle sem HMF (—■—), 218 mg.L⁻¹ (—●—), 331 mg.L⁻¹ (—▲—), 424 mg.L⁻¹ (—▼—), 454 mg.L⁻¹ (—◆—) e 553 mg.L⁻¹ (—◆—) de HMF. 128

Figura 5.17 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de HMF em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem HMF (—■—), 218 mg.L⁻¹ (—●—), 331 mg.L⁻¹ (—▲—), 424 mg.L⁻¹ (—▼—), 454 mg.L⁻¹ (—◆—) e 553 mg.L⁻¹ (—◆—) de HMF. 130

Figura 5.18 - Cinética de consumo de HMF por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de HMF em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem HMF (—■—), 218 mg.L⁻¹ (—●—), 331 mg.L⁻¹ (—▲—), 424 mg.L⁻¹ (—▼—), 454 mg.L⁻¹ (—◆—) e 553 mg.L⁻¹ (—◆—) de HMF. 133

Figura 5.19 - Efeito do HMF relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—✕—). 136

Figura 5.20 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de vanilina em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem vanilina (—■—), 55 mg.L⁻¹ (—●—), 79 mg.L⁻¹ (—▲—), 117 mg.L⁻¹ (—▼—) e 175 mg.L⁻¹ (—◆—) de vanilina. 140

Figura 5.21 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de vanilina em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem vanilina (—■—), 55 mg.L⁻¹ (—●—), 79 mg.L⁻¹ (—▲—), 117 mg.L⁻¹ (—▼—) e 175 mg.L⁻¹ (—◆—) de vanilina. 142

Figura 5.22 - Cinética de consumo de vanilina por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de vanilina em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 55 mg.L⁻¹ (—●—), 79 mg.L⁻¹ (—▲—), 117 mg.L⁻¹ (—▼—) e 175 mg.L⁻¹ (—◆—) de vanilina. 144

Figura 5.23 - Varredura espectral no ultravioleta dos meios de fermentação adicionados de vanilina nas concentrações iniciais de (A) 55 mg.L⁻¹, (B) 79 mg.L⁻¹, (C) 117 mg.L⁻¹ e (D) 175 mg.L⁻¹. Nas imagens, as cores representam: controle no tempo de 0 horas (—), ensaio com vanilina no tempo de 0 horas (—) e ensaio com vanilina no tempo de 30 horas (—). 145

Figura 5.24 - Cinética de formação de álcool vanilil (A) e ácido vanílico (B) como produtos da bioconversão da vanilina por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de vanilina em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 55 mg.L⁻¹ (—●—), 79 mg.L⁻¹ (—▲—), 117 mg.L⁻¹ (—▼—) e 175 mg.L⁻¹ (—◆—) de vanilina. 147

Figura 5.25 - Efeito da vanilina relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de

açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—✱—). 149

Figura 5.26 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de siringaldeído em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem siringaldeído (—■—), 90 mg.L⁻¹ (—●—), 170 mg.L⁻¹ (—▲—), 302 mg.L⁻¹ (—▼—) e 466 mg.L⁻¹ (—◆—) e 620 mg.L⁻¹ (—►—) de siringaldeído. 153

Figura 5.27 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de siringaldeído em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem siringaldeído (—■—), 90 mg.L⁻¹ (—●—), 170 mg.L⁻¹ (—▲—), 302 mg.L⁻¹ (—▼—) e 466 mg.L⁻¹ (—◆—) e 620 mg.L⁻¹ (—►—) de siringaldeído. 155

Figura 5.28 - Cinética de consumo de siringaldeído por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de siringaldeído em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 90 mg.L⁻¹ (—●—), 170 mg.L⁻¹ (—▲—), 302 mg.L⁻¹ (—▼—) e 466 mg.L⁻¹ (—◆—) e 620 mg.L⁻¹ (—►—) de siringaldeído. 157

Figura 5.29 - Perfil de assimilação de siringaldeído por *Pichia stipitis* em função de concentração inicial deste composto no meio de fermentação. As cores representam: concentração de siringaldeído assimilada (—■—) e porcentagem do siringaldeído inicial assimilado (—★—). 157

Figura 5.30 - Varredura espectral no ultravioleta dos meios de fermentação adicionados de siringaldeído nas concentrações iniciais de (A) 90 mg.L⁻¹, (B) 170 mg.L⁻¹, (C) 302 mg.L⁻¹, (D) 466 mg.L⁻¹ e (E) 620 mg.L⁻¹. Nas imagens, as cores representam: controle no tempo de 0 horas (—), ensaio com siringaldeído no tempo de 0 horas (—) e ensaio com siringaldeído no tempo de 30 horas (—). . 159

Figura 5.31 - Perfil cromatográfico obtido pela análise de amostras de meio de fermentação adicionados de siringaldeído, onde são observados produtos metabólicos como o ácido síngico e um produto não-identificado (NI), o qual poderia corresponder ao álcool síngico. 160

Figura 5.32 - Efeito do siringaldeído relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—✱—). 162

Figura 5.33 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido ferúlico em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem ácido ferúlico (—■—), 105 mg.L⁻¹ (—●—), 183 mg.L⁻¹ (—▲—), 290 mg.L⁻¹ (—▼—), 567 mg.L⁻¹ (—◆—) e 802 mg.L⁻¹ (—►—) de ácido ferúlico. 166

Figura 5.34 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido ferúlico em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem ácido ferúlico (—■—), 105 mg.L⁻¹ (—●—), 183 mg.L⁻¹ (—▲—), 290 mg.L⁻¹ (—▼—), 567 mg.L⁻¹ (—◆—) e 802 mg.L⁻¹ (—►—) de ácido ferúlico. 167

Figura 5.35 - Cinética de consumo de ácido ferúlico por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido ferúlico em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 105 mg.L⁻¹ (—●—), 183 mg.L⁻¹ (—▲—), 290 mg.L⁻¹ (—▼—), 567 mg.L⁻¹ (—◆—) e 802 mg.L⁻¹ (—►—) de ácido ferúlico. 169

Figura 5.36 - Varredura espectral no ultravioleta dos meios de fermentação adicionados de ácido ferúlico nas concentrações iniciais de (A) 105 mg.L⁻¹, (B) 183 mg.L⁻¹, (C) 290 mg.L⁻¹, (D) 567 mg.L⁻¹ e (E) 802 mg.L⁻¹. Nas imagens, as cores representam: controle no tempo de 0 horas (—), ensaio com ácido ferúlico no tempo de 0 horas (—) e ensaio com ácido ferúlico no tempo de 30 horas (—). 171

Figura 5.37 - Efeito do ácido ferúlico relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—✱—). 173

Figura 5.38 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido *p*-cumárico em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem ácido *p*-cumárico (—■—), 45 mg.L⁻¹ (—●—), 150 mg.L⁻¹ (—▲—), 233 mg.L⁻¹ (—▼—), 319 mg.L⁻¹ (—◆—) e 423 mg.L⁻¹ (—►—) de ácido *p*-cumárico. 177

Figura 5.39 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido *p*-cumárico em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: As cores representam: controle sem ácido *p*-cumárico (—■—), 45 mg.L⁻¹ (—●—), 150 mg.L⁻¹ (—▲—), 233 mg.L⁻¹ (—▼—), 319 mg.L⁻¹ (—◆—) e 423 mg.L⁻¹ (—►—) de ácido *p*-cumárico. 178

Figura 5.40 - Cinética de consumo de ácido *p*-cumárico por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido *p*-cumárico em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 45 mg.L⁻¹ (—●—), 150 mg.L⁻¹ (—▲—), 233 mg.L⁻¹ (—▼—), 319 mg.L⁻¹ (—◆—) e 423 mg.L⁻¹ (—►—) de ácido *p*-cumárico. 180

Figura 5.41 - Varredura espectral no ultravioleta dos meios de fermentação adicionados de ácido *p*-cumárico nas concentrações iniciais de (A) 45 mg.L⁻¹, (B) 150 mg.L⁻¹, (C) 233 mg.L⁻¹, (D) 319 mg.L⁻¹, (E) 423 mg.L⁻¹. Nas imagens, as cores representam: controle no tempo de 0 horas (—), ensaio com ácido *p*-cumárico no tempo de 0 horas (—) e ensaio com ácido *p*-cumárico no tempo de 30 horas (—). 181

Figura 5.42 - Efeito do ácido *p*-cumárico relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—✱—).183

Figura 5.43 - Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose, produção de etanol e crescimento celular de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. As cores representam: glicose (—✱—), xilose (—◆—), arabinose (—●—), etanol (—■—) e células (—●—).187

Figura 5.44 - Cinética de assimilação de compostos ácidos fracos, furanos e fenólicos de baixa massa molar por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. As cores representam: ácido acético (—◆—), furfural (—■—), HMF (—▲—), vanilina (—●—), ácido ferúlico (—✱—) e ácido *p*-cumárico (—■—)...187

Figura 5.45 - Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose, produção de etanol e crescimento celular de *Pichia stipitis* em meio sintético com composição química semelhante à do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. As cores representam: glicose (—✱—), xilose (—◆—), arabinose (—●—), etanol (—■—) e células (—●—).190

Figura 5.46 - Cinética de assimilação de compostos ácidos fracos, furanos e fenólicos de baixa massa molar por *Pichia stipitis* em meio sintético com composição química semelhante à do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. As cores representam: ácido acético (—◆—), furfural (—■—), HMF (—▲—), vanilina (—●—), ácido ferúlico (—✱—) e ácido *p*-cumárico (—■—).190

Figura 5.47 - Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose, produção de etanol e crescimento celular de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. As cores representam: glicose (—✱—), xilose (—◆—), arabinose (—●—), etanol (—■—) e células (—●—).192

Figura 5.48 - Cinética de assimilação de compostos ácidos fracos, furanos e fenólicos de baixa massa molar por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. As cores representam: ácido acético (—◆—), furfural (—■—), HMF (—▲—), vanilina (—●—), ácido ferúlico (—✱—) e ácido *p*-cumárico (—■—)...192

Figura 5.49 - Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose, produção de etanol e crescimento celular de *Pichia stipitis* em meio sintético com composição química semelhante à do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. As cores representam: glicose (—✱—), xilose (—◆—), arabinose (—●—), etanol (—■—) e células (—●—).195

Figura 5.50 - Cinética de assimilação de compostos ácidos fracos, furanos e fenólicos de baixa massa molar por *Pichia stipitis* em meio sintético com composição química semelhante à do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. As cores representam: ácido acético (—◆—), furfural (—■—), HMF (—▲—), vanilina (—●—), ácido ferúlico (—✱—) e ácido *p*-cumárico (—■—).195

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição química parcial em porcentagem de matéria seca para diferentes materiais lignocelulósicos.	35
Tabela 4.1 - Composição do meio de cultura.	72
Tabela 4.2 - Compostos utilizados para construção das curvas de calibração com respectivos graus de pureza e fabricantes.	74
Tabela 4.3 - Concentrações dos compostos na solução estoque para construção de curva de calibração na coluna ZORBAX Eclipse Plus C18.....	75
Tabela 4.4 - Concentrações dos compostos na solução estoque para construção de curva de calibração na coluna Waters Spherisorb C18.	75
Tabela 4.5 - Condições empregadas para obtenção dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e bagaço de malte.	79
Tabela 4.6 - Meio de cultura utilizado para preparo do inóculo.	81
Tabela 4.7 - Composição do meio de fermentação.	82
Tabela 5.1 - Curvas de calibração, coeficientes de correlação e tempos de retenção obtidos na análise de compostos furanos e fenólicos utilizando-se a coluna ZORBAX Eclipse Plus C18.	92
Tabela 5.2 - Curvas de calibração, coeficientes de correlação e tempos de retenção obtidos na análise de compostos furanos e fenólicos utilizando-se a coluna Waters Spherisorb ODS2.....	95
Tabela 5.3 - Caracterização química da palha de arroz <i>in natura</i> (CASTRO, 2012).	96
Tabela 5.4 - Composição de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtido por hidrólise ácida, não concentrado e concentrado.....	97
Tabela 5.5 - Caracterização dos compostos com potencial inibidor presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.	98
Tabela 5.6 - Composição de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte obtido por hidrólise ácida, concentrado.....	99
Tabela 5.7 - Caracterização dos compostos com potencial inibidor presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte.....	100
Tabela 5.8 - Coeficientes lineares, angulares e de correlação obtidos pela regressão linear dos dados de cinética de consumo de ácido acético em diferentes concentrações iniciais pela levedura <i>Pichia stipitis</i>	109
Tabela 5.9 - Efeito do ácido acético sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por <i>Pichia stipitis</i>	111

Tabela 5.10 - Efeito do ácido acético sobre os parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i> em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.	112
Tabela 5.11 - Efeito do furfural sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por <i>Pichia stipitis</i>	123
Tabela 5.12 - Efeito do furfural sobre os parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i> em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.	126
Tabela 5.13 - Efeito do HMF sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por <i>Pichia stipitis</i>	136
Tabela 5.14 - Efeito do HMF sobre os parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i> em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.	137
Tabela 5.15 - Efeito da vanilina sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por <i>Pichia stipitis</i>	149
Tabela 5.16 - Efeito da vanilina sobre os parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i> em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.	150
Tabela 5.17 - Efeito do siringaldeído sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por <i>Pichia stipitis</i>	162
Tabela 5.18 - Efeito do siringaldeído sobre os parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i> em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.	163
Tabela 5.19 - Efeito do ácido ferúlico sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por <i>Pichia stipitis</i>	173
Tabela 5.20 - Efeito do ácido ferúlico sobre os parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i> em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.	174
Tabela 5.21 - Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por <i>Pichia stipitis</i>	183
Tabela 5.22 - Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre os parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i> em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.	184
Tabela 5.23 - Parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i> em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e bagaço de malte bem como em meios sintéticos mimetizando a composição química destes hidrolisados.	198
Tabela 5.24 – Análise comparativa dos efeitos dos inibidores sobre os parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i> em concentrações próximas às encontradas nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (HHPA) e de bagaço de malte (HHBM).	202

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1.	Importância do etanol como biocombustível	25
2.2.	Métodos e matérias primas para produção de etanol.....	26
•	Materiais lignocelulósicos	28
•	A palha de arroz e o bagaço de malte.....	34
•	Hidrólise ácida	39
2.3.	Produção de etanol a partir de xilose: aspectos gerais	40
2.4.	Principais compostos inibidores do metabolismo microbiano gerados durante o processo de hidrólise com ácido diluído	45
2.4.1.	Ácidos orgânicos alifáticos fracos	48
2.4.1.1.	Ácido acético	49
2.4.2.	Compostos furanos	52
2.4.2.1.	Furfural	56
2.4.2.2.	5-Hidroximetilfurfural	58
2.4.3.	Compostos fenólicos	60
2.4.3.1.	Vanilina.....	62
2.4.3.2.	Siringaldeído	64
2.4.3.3.	Ácido ferúlico.....	66
2.4.3.4.	Ácido p-cumárico.....	67
2.4.4.	Efeito interativo dos compostos inibidores	68
3.	OBJETIVOS	70
3.1.	Objetivo geral	70
3.2.	Objetivos específicos.....	70
4.	MATERIAL E MÉTODOS	71
4.1.	Adaptação de metodologias analíticas	71
4.1.1.	Curvas de calibração para determinação da concentração celular	71
4.1.1.1.	Curva de calibração em meio semissintético	71
4.1.1.2.	Curva de calibração em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz	72
4.1.1.3.	Curva de calibração em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte.	73
4.1.2.	Cromatografia líquida de alta eficiência para análise de furanos e compostos fenólicos.....	73
4.1.2.1.	Padrões cromatográficos.....	73
4.1.2.2.	Reagentes	73
4.1.2.3.	Instrumentos analíticos.....	73

4.1.2.4. Método de quantificação	74
4.2. Obtenção e caracterização da matéria prima.....	76
4.2.1. Matéria prima	76
4.2.2. Caracterização da palha de arroz	76
4.3. Obtenção e caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e bagaço de malte.	78
4.4. Ensaio fermentativo.....	79
4.4.1. Preparo do inóculo	80
4.4.1.1. Meio semissintético.....	80
4.4.1.2. Hidrolisados hemicelulósicos	81
4.4.2. Meio e condições de fermentação	81
4.4.2.1. Efeito individual dos inibidores.....	81
4.4.2.2. Perfil fermentativo da levedura <i>Pichia stipitis</i> em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e de bagaço de malte	83
4.5. Acompanhamento analítico dos experimentos.....	84
4.5.1. Determinação do teor de umidade da palha de arroz	84
4.5.2. Concentração celular	84
4.5.3. Determinação do pH	85
4.5.4. Varredura espectral em UV.....	85
4.5.5. Determinação da concentração de açúcares, etanol e ácido acético	85
4.5.6. Determinação das concentrações de furanos e compostos fenólicos de baixa massa molar.....	86
4.6. Metodologia de análise dos resultados	86
4.6.1. Determinação dos parâmetros fermentativos.....	86
4.6.2. Determinação da porcentagem de decréscimo dos compostos fenólicos e dos açúcares	87
4.6.3. Construção de gráficos e ajuste de dados	88
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
5.1. Obtenção da curva de calibração DO X massa seca.....	89
5.2. Obtenção de curvas de calibração para análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	91
5.3. Caracterização química da palha de arroz.....	95
5.4. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz quanto ao teor de açúcares e compostos com potencial inibidor do metabolismo microbiano..	96
5.5. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte quanto ao teor de açúcares e compostos com potencial inibidor do metabolismo microbiano	99
5.6. Impacto individual dos compostos inibidores sobre o comportamento da levedura <i>Pichia stipitis</i> em meio semissintético	100

5.6.1. Ácido acético	101
5.6.2. Furfural	114
5.6.3. 5-hidroximetilfurfural	127
5.6.4. Vanilina.....	138
5.6.5. Siringaldeído	151
5.6.6. Ácido ferúlico.....	164
5.6.7. Ácido <i>p</i> -cumárico.....	175
5.7. Fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de bagaço de malte por <i>Pichia stipitis</i>	185
5.7.1. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.....	186
5.7.2. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte	191
5.7.3. Parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i> em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e bagaço de malte.....	197
5.8. Efeito comparativo dos inibidores sobre os parâmetros fermentativos em concentrações presentes nos hidrolisados-modelo	201
6. CONCLUSÕES	204
REFERÊNCIAS.....	207

1. INTRODUÇÃO

Entre as diversas aplicações do etanol, seu uso como combustível em substituição aos combustíveis fósseis tem ganhado importância devido a fatores econômicos, ambientais e sociais. O etanol é um combustível de origem renovável, amplamente difundido no Brasil desde a década de 1980 após o ProAlcool, quando sua utilização se tornou mais viável economicamente que o uso de combustíveis fósseis, devido à crise do petróleo. Ainda hoje, o etanol tem grande popularidade no setor de transportes no país devido à grande frota de carros “*flex*”, os quais podem ser movidos com misturas de álcool e gasolina em qualquer proporção. Mundialmente, o interesse pela produção de etanol tem crescido em países que empregam combustíveis fósseis como principal fonte de energia, pois os derivados do petróleo são provenientes de fontes limitadas e, além disso, sua combustão libera grandes quantidades de gases causadores do efeito estufa na atmosfera. Desta forma, o uso de combustíveis renováveis, como o etanol, se torna interessante na tentativa de atender a crescente demanda energética mundial, além de diminuir o impacto ambiental e desenvolver regiões rurais.

O etanol é produzido por processos fermentativos bem estabelecidos a partir de materiais sacaríneos, como beterraba e cana de açúcar, cujos açúcares podem ser diretamente fermentados a etanol por micro-organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, e também materiais amiláceos, como o milho e a cevada, nos quais os açúcares oriundos do amido são liberados por sacarificação enzimática e então fermentados a etanol. Uma alternativa que vem sendo estudada para produção de etanol é o uso de materiais lignocelulósicos como matéria prima, por serem renováveis, abundantes e terem baixo custo.

Os materiais lignocelulósicos são constituídos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, em proporções que variam em função da espécie vegetal, origem do material entre outros fatores. As frações de celulose e hemicelulose, as quais são ricas em hexoses e pentoses, respectivamente, podem ser fermentadas por micro-organismos específicos com a finalidade de produzir etanol. Para que este processo ocorra, se faz necessário um fracionamento destes componentes, o qual pode ser realizado por hidrólise com ácido diluído quando há interesse na fração hemicelulósica do material, solubilizando a hemicelulose e deixando uma

fração sólida constituída por celulose e lignina, que também pode ser aproveitada em outros processos.

A solubilização da hemicelulose origina um licor rico em pentoses, principalmente a xilose no caso de gramíneas como a palha de arroz, e estes açúcares podem ser fermentados a etanol por micro-organismos com sistemas enzimáticos que permitam esta conversão de maneira eficiente. Entre os possíveis micro-organismos fermentadores de pentoses a etanol, a levedura *Pichia stipitis* tem importância destacada por possuir um sistema enzimático de fermentação de xilose que minimiza a produção de xilitol como subproduto da fermentação. A fermentação destes hidrolisados é influenciada por diversos fatores ambientais como concentração de substrato, pH do meio, nível de aeração, suplementação com nutrientes e a presença de compostos inibidores do metabolismo microbiano.

Os compostos inibidores são gerados durante a hidrólise das matérias primas lignocelulósicas, e sua composição e quantidade nos hidrolisados hemicelulósicos é variável em função do material utilizado e da severidade do processo de hidrólise. A origem destes compostos pode ser a liberação de componentes estruturais, como o acetato das acetilxilanas e os ácido ferúlico e *p*-cumárico que formam pontes entre a hemicelulose e a lignina, podem ser produtos da degradação de pentoses e hexoses, como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural, respectivamente, ou ainda podem ser produtos de degradação da lignina, como os compostos fenólicos vanilina e siringaldeído.

Há relatos de que estes compostos inibem o metabolismo fermentativo de micro-organismos, abaixando o pH intracelular, interferindo na atividade de enzimas chave do metabolismo, causando danos ao DNA e ainda diminuindo a seletividade da membrana plasmática de micro-organismos. Tendo em vista que o conhecimento detalhado sobre comportamento da levedura na presença destes compostos permite elaborar estratégias de destoxificação, caso se mostrem necessárias, a fim de melhorar o processo fermentativo para obtenção de etanol, o presente trabalho visa avaliar a influência de ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural, vanilina, siringaldeído, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico sobre o perfil fermentativo de *Pichia stipitis*. Para atingir os objetivos do trabalho, foram utilizadas as concentrações presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de bagaço de malte como modelo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância do etanol como biocombustível

O incentivo à utilização do etanol como combustível no Brasil ganhou destaque nos anos 1970 com a implementação do programa ProAlcool pelo governo, em 1975. Um dos principais objetivos do programa foi o de proteger o país dos aumentos no preço do petróleo devido à crise mundial de abastecimento e, para isso, o governo inicialmente estabeleceu a prática de adição de 5% de etanol à gasolina, o que incentivou o setor canavieiro no Brasil e promoveu a otimização do processo de produção de álcool por meio de pesquisa e desenvolvimento. Após algum tempo, os automóveis no país passaram a ser produzidos com motores capazes de funcionar com combustível 100% a base de etanol hidratado. A popularidade do etanol como combustível decaiu em 1985, com a queda dos preços internacionais do petróleo, cuja utilização se tornou mais vantajosa economicamente que o etanol de cana de açúcar, aliada aos problemas na logística de abastecimento e à recuperação dos preços do açúcar no mercado internacional. No entanto, a partir de 2003, com o surgimento e subsequente popularização dos carros com motores *flex*, que podem ser movidos a etanol e gasolina em uma mistura de qualquer proporção, o etanol retomou importância como combustível nacionalmente (GOLDEMBERG; NIGRO; COELHO, 2008; MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009).

No contexto mundial, é observada a crescente demanda por energia até 2030, tanto para os setores residencial, de serviços e agricultura, como principalmente para os setores de transportes e industrial, nos quais a demanda por energia deve crescer a uma taxa anual de 1,6% e 1,7%, respectivamente (IEA, 2009). Para suprir esta necessidade, a energia renovável é uma alternativa viável, tendo em vista a natureza finita das fontes de combustíveis fósseis. A demanda por biocombustíveis, como o etanol, pode ser vista como um incentivo para a produção agrícola nos países em desenvolvimento, cuja economia é amplamente dependente da agricultura, pois é uma oportunidade de ampliar o desenvolvimento rural e reduzir a pobreza nestas regiões (FAO, 2008).

Além das questões econômicas que envolvem a substituição da gasolina pelo etanol ou o uso concomitante de ambos, existem ainda as preocupações

ambientais. Desde a revolução industrial, as emissões anuais de CO₂ provenientes da queima de combustíveis cresceram exponencialmente, saindo de um valor próximo de zero para atingir os 29 bilhões de toneladas em 2009. Entre as atividades humanas produtoras de gases causadores do efeito estufa, o uso de energia é a mais expressiva, correspondendo a mais de 80% destas emissões. O CO₂ é um subproduto da queima de combustíveis, gerado pela oxidação destes compostos ricos em carbono (IEA, 2011).

A mistura do etanol à gasolina é uma prática comum em países como EUA e Brasil, a qual apresenta três benefícios principais: redução na utilização da gasolina, aumento da octanagem da gasolina e aumento do oxigênio na mistura, o que resulta em uma combustão mais eficiente e na diminuição das emissões de monóxido de carbono (WYMAN, 1994; PRASAD; SINGH; JOSHI, 2007). Além disso, a utilização do etanol como combustível permite a reciclagem do dióxido de carbono produzido durante a combustão por meio de processos fotossintéticos, o que significa que não há aumento líquido na taxa desse gás causador de efeito estufa na atmosfera (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001).

2.2. Métodos e matérias primas para produção de etanol

O etanol pode ser produzido por síntese química ou biológica. A via química de produção de etanol ocorre pela hidratação do etileno em meio ácido através de uma catálise sólido líquido (SOLOMONS; FRYHLE, 2005). Um dos inconvenientes da síntese química é a utilização de altas pressões, requeridas ao equilíbrio químico do processo, além dos problemas de corrosão dos equipamentos em função da presença do ácido (ISHIHARA et al., 1997).

A via biológica de produção do etanol utiliza micro-organismos como catalisadores do processo, por meio da fermentação de materiais orgânicos açucarados. As principais matérias-primas são aquelas constituídas de sacarose ou amido que, após terem seus polissacarídeos reduzidos a monômeros (glicose/frutose), podem ser convertidos a etanol pela ação dos micro-organismos fermentadores (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001; FESTEL, 2008). Brasil e Estados Unidos são os maiores produtores globais de etanol, sendo responsáveis por 90% da produção mundial, de acordo com a FAO (2008). Os outros 10% da

produção são atribuídos principalmente ao Canadá, China e União Europeia (Alemanha e França).

Segundo a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA, 2012), o Brasil produziu na safra 2008/09 mais de 27,5 bilhões de litros de etanol. A maior parte do etanol no Brasil é produzida a partir de cana de açúcar e as projeções para sua produção nos próximos anos são positivas, principalmente devido ao consumo interno. Para 2019, estima-se uma produção de 58,8 bilhões de litros, dos quais 50 bilhões de litros são estimados para o consumo interno e 8,8 bilhões estão projetados para as exportações (BRASIL, 2012).

A produção de cana de açúcar e etanol no Brasil está concentrada principalmente nas regiões Centro-Sul e Nordeste. Para a obtenção do etanol, a cana é cortada e transportada o mais cedo possível para as usinas, a fim de evitar perdas de sacarose. Nas usinas, a cana é lavada e o caldo é extraído por meio de moendas ou difusores, e o bagaço é comumente queimado em caldeiras para produção de energia na própria usina. O caldo de cana passa então por processos de calagem, aquecimento e decantação e, após este tratamento, é evaporado para o ajuste das concentrações de açúcares. O caldo pode ser misturado ao melaço dando origem ao mosto, que pode ser fermentado. A fermentação ocorre em dornas por 8 a 12 horas e o micro-organismo utilizado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O vinho produzido tem 7% a 10% de álcool o qual é destilado dando origem ao etanol hidratado, que pode ser comercializado ou desidratado para produção do etanol anidro (BNDES; CGEE, 2008).

Nos Estados Unidos, a produção de etanol se baseia na fermentação dos açúcares do amido, sendo o milho a principal matéria prima devido a sua abundância e baixo custo (EIA, 2012).

O processamento do milho para obtenção de etanol pode ser realizado por moagem úmida ou seca. Até os anos 1990, a moagem úmida era a mais empregada. Neste processo, é possível separar as diversas frações do milho, sendo o óleo de milho a fração mais valiosa e o amido, produzido em maior volume. À fração de amido obtida pelo processamento inicial, são adicionadas enzimas que irão hidrolisá-lo em glicose para subsequente fermentação. O processo de moagem seca é o mais utilizado atualmente, por ter custo mais baixo. Nele, as sementes de milho são degerminadas e moídas para se obter uma farinha. O gérmen é utilizado para extração do óleo de milho e a farinha obtida

pela moagem pode ser processada para obtenção de produtos finais como farinhas e flocos de milho ou pode ocorrer adição de enzimas para promover a sacarificação, com subsequente resfriamento e fermentação. Assim como na produção de etanol de cana de açúcar, a fermentação é feita pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e os métodos de destilação e desidratação também são similares. Os sólidos obtidos como resíduos após a fermentação pelo processo de moagem seca são utilizados para alimentação animal (DDG – *distillers dry grains*) (BNDES; CGEE, 2008; MUSSOLINI, 2009; SOETAERT; VANDAMME, 2009).

A bioenergia representa uma expressiva fonte de demanda para produtos agrícolas, o que a torna promissora para a criação de renda e emprego. Em contrapartida, a produção dos biocombustíveis gera aumento na competição por recursos naturais, com destaque para a água e as terras agricultáveis, principalmente quando algumas culturas tradicionalmente utilizadas para alimentação, como o milho e a soja, são empregadas na geração de bioenergia ou mesmo se terras destinadas ao plantio de culturas alimentícias são redirecionadas para a produção dos biocombustíveis (FAO, 2008). Tendo em vista este contexto, uma produção alternativa que vem sendo estudada é a obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Estas matérias primas são de grande interesse para a produção de combustíveis por serem abundantes e de baixo custo, o que é uma característica de fundamental importância para o custo final do etanol, uma vez que o custo da matéria prima pode atingir até 40% do valor total (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). Estes materiais são subprodutos agrícolas (talos, cascas, palhas, bagaços), resíduos florestais (podas de florestas, subprodutos de madeira) e diversos resíduos municipais.

- **Materiais lignocelulósicos**

Materiais lignocelulósicos são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A proporção e composição química da lignina e hemicelulose são inconstantes nas diferentes fontes do material, enquanto a celulose é um componente uniforme quanto à composição mas apresenta proporções variadas nas diversas fontes (FENGEL; WEGENER, 1984). Outros

constituintes poliméricos presentes em menores e mais variadas quantidades são amido, pectina, além de cinzas (HON; SHIRAISHI, 2001).

A **celulose** é o principal componente das madeiras, e corresponde a aproximadamente metade da biomassa, tanto em plantas folhosas (dicotiledôneas) quanto nas coníferas (gimnospermas). A celulose é um polímero linear de alta massa molar, constituído apenas por unidades de β -D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ formando resíduos de celobiose, os quais são as unidades repetitivas na cadeia de celulose. Como as moléculas de glicose se encontram na configuração β , resíduos alternados de glicose sofrem uma rotação de 180° , o que resulta em moléculas individuais lineares e rígidas, mantidas por ligações de hidrogênio intramoleculares, o que favorece a organização das cadeias. Estas cadeias são organizadas por meio da formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, as quais são responsáveis pela formação das microfibrilas de celulose, que são estruturas que apresentam regiões altamente organizadas (cristalinas) alternadas com outras de menor organização (amorfas). O conjunto de microfibrilas forma as fibrilas que por sua vez formam as fibras de celulose. A presença de muitos grupamentos hidroxila é responsável não somente pela formação da estrutura supramolecular, como também pelo comportamento químico e físico da celulose. Como consequência da estrutura fibrosa, a celulose apresenta alta resistência à força de tensão e é insolúvel em grande parte dos solventes. Devido a estas propriedades físicas e químicas, esta molécula é capaz de exercer sua função como o principal componente estrutural da parede celular vegetal (FENGEL; WEGENER, 1984; GOLDSTEIN, 1991; SJÖSTRÖM, 1993).

A **hemicelulose** está intimamente associada à celulose na parede celular. É uma classe heterogênea de polissacarídeos a qual representa, em geral, 30-35% da biomassa vegetal e contem cinco açúcares neutros, as hexoses β -D-glicose, β -D-manose e α -D-galactose e as pentoses β -D-xilose e α -L-arabinose como sendo seus principais constituintes. Algumas hemiceluloses podem conter também ácidos urônicos, como os ácidos α -D-glucurônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e α -D-galacturônico. As cadeias moleculares da hemicelulose são mais curtas em comparação com as cadeias de celulose, e contem grupos laterais, podendo ser ramificadas em alguns casos. Outros açúcares como α -L-ramnose e α -L-fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades

e os grupos hidroxila dos açúcares podem estar parcialmente substituídos com grupos acetil (FENGEL; WEGENER, 1984; GIRIO et al., 2010).

As hemiceluloses podem ser classificadas em função dos diferentes tipos de açúcares que as compõem, sendo chamadas de xilanas, mananas, galactanas e assim por diante. As xilanas são muito abundantes, podendo corresponder a 50% de alguns tecidos de gramíneas (FENGEL; WEGENER, 1984; GIRIO et al., 2010).

As xilanas são polioses com uma cadeia principal constituída por resíduos de xilopirranose unidos por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, e sua estrutura é variável em diferentes tipos de biomassas vegetais, como gramíneas, folhosas e coníferas. A Figura 2.1 é a representação esquemática da classificação das diferentes fontes de biomassa, a qual será empregada para descrever as variações na composição química das xilanas nestes diferentes tipos de vegetais.

Figura 2.1 - Esquema classificatório das diferentes fontes de biomassas.

As xilanas de folhosas são constituídas por uma cadeia de aproximadamente 200 resíduos de β -xilopirranose, unidos por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$. A cada dez unidades de xilose, aproximadamente, é observada uma cadeia lateral que consiste de uma única molécula de ácido 4-O-metilglucurônico ligado diretamente à hidroxila em C2 na xilose. Além disso, sete em cada 10 resíduos de xilose apresentam grupos O-acetil ligados nas posições C2, C3 ou em ambas (PULS; SCHUSEIL, 1993). A estrutura parcial da xilana das folhosas está representada na Figura 2.2.

Figura 2.2 – Representação esquemática da estrutura química parcial de O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana de dicotiledôneas (PULS; SCHUSEIL, 1993).

As xilanas de coníferas (gimnospermas) não apresentam grupos acetil mas, em contrapartida, tem uma maior proporção de ácido 4-O-metilglucurônico que as xilanas de folhosas, os quais estão ligados ao C2 de sete a cada 10 resíduos de xilose na cadeia principal. Há ainda a presença de unidades de α -L-arabinofuranose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1\rightarrow3)$ ao esqueleto de xilana, sendo encontrada uma arabinose a cada 7 ou 8 resíduos de xilose. As cadeias também são menores, com grau de polimerização variando entre 70 e 130, e são levemente ramificadas, com uma ou duas cadeias laterais por molécula (FENGEL; WEGENER, 1984; PULS; SCHUSEIL, 1993). A estrutura química das xilanas de gimnospermas está esquematizada na Figura 2.3.

Figura 2.3 – Representação esquemática da estrutura química parcial de arabino-4-O-metilglucuronoxilana de gimnospermas (PULS; SCHUSEIL, 1993).

As xilanas nas monocotiledôneas são o principal componente hemicelulósico da sua parede celular primária. Existe uma grande variedade de estruturas de xilanas em gramíneas, o que varia em função da espécie em questão, bem como de tecidos diferentes em uma mesma espécie. Quando comparadas às xilanas das madeiras, observa-se que, apesar de apresentar o mesmo tipo de cadeia principal, as xilanas de gramíneas são mais ramificadas, além de possuir maior proporção de unidades L-arabinofuranosil. A cadeia principal é substituída por ácido 4-O-metil- β -D-glucopiranosil urônico em ligações do tipo α . Sabe-se também que as xilanas das gramíneas apresentam grupos acetil esterificados ao C2 e C3 dos resíduos de xilose. O grau de substituição por cadeias laterais está diretamente relacionado à solubilidade da xilana e à sua habilidade em ligar-se à celulose, ou seja, aquelas cadeias que possuem maior quantidade de cadeias laterais apresentam maior solubilidade em água e se ligam mais fracamente à celulose. A parede celular das monocotiledôneas do tipo gramínea apresenta também substituintes do tipo ácidos fenólicos, que são ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, esterificados ao O-5 da cadeia lateral de arabinofuranosil. Os ésteres feruloil são acoplados por uma reação catalisada por peroxidases, com a síntese de um grupo diferuloil, o qual forma uma ligação cruzada entre duas moléculas de xilana (HON; SHIRAIISHI, 2001; PULS; SCHUSEIL, 1993). O grau de polimerização é de aproximadamente 90 (FENGEL; WEGENER, 1984). A estrutura química parcial das xilanas de gramíneas está representada na Figura 2.4.

Figura 2.4 - Representação esquemática da estrutura química parcial de xilana de gramíneas, com ácido ferúlico (ou ácido *p*-cumárico) ligados ao O-5 da cadeia lateral de arabinofuranosil (PULS; SCHUSEIL, 1993).

A **lignina** é o terceiro principal componente macromolecular das madeiras. Do ponto de vista morfológico, a lignina é uma substância amorfa localizada na lamela média bem como na parede celular secundária do vegetal. Ela atua como um cimento entre as fibras da madeira, favorecendo o enrijecimento e formando uma barreira à degradação enzimática da parede celular. Durante o desenvolvimento das células, a lignina é o último componente incorporado na parede celular, penetrando pelas fibrilas e reforçando a parede (FENGEL; WEGENER, 1984; SJÖSTRÖM, 1993). A molécula de lignina é estruturada de uma maneira que difere daquela pela qual os polissacarídeos o são, pois consiste de um sistema aromático tridimensional composto por unidades de fenilpropano unidas por diferentes tipos de ligações químicas, entre elas ligações éter e ligações C-C. Estes precursores da lignina encontram-se na forma de álcoois *p*-hidroxicinâmicos, representados na Figura 2.5, e a polimerização se dá pela desidrogenação enzimática destas unidades precursoras seguida por um acoplamento de radicais (HON; SHIRAIISHI, 2001; SJÖSTRÖM, 1993). A polimerização dos precursores monoméricos para a formação da macromolécula de lignina ocorre por reações de acoplamento aleatório, em um processo espontâneo não mediado por enzimas. Por possuir complexas ligações carbono-carbono entre as unidades formadoras, a lignina é um polímero de difícil degradação a fragmentos de baixa massa molar, e essa característica, além de sua complexidade estrutural, dificultam a elucidação de sua estrutura química (FENGEL; WEGENER, 1984).

Por ser heterogênea em sua composição quando se comparam diferentes tipos vegetais, a lignina pode ser classificada em tipos guaiacil (G), cujas unidades são derivadas do precursor álcool *trans*-coniferílico, siringil (S) cujas unidades são derivadas do álcool *trans*-sinapílico e *p*-hidroxifenil (H), com unidades derivadas do ácido *trans-p*-cumarílico. As ligninas de folhosas são do tipo GS, enquanto as de coníferas são predominantemente do tipo G e as gramíneas são GSH, com núcleo aromático guaiacil e siringil somado de pequenas quantidades de unidades *p*-hidroxifenil (FENGEL; WEGENER, 1984; HON; SHIRAIISHI, 2001).

Figura 2.5 - Unidades de fenilpropano precursoras da macromolécula de lignina (FENGEL; WEGENER, 1984).

Na Tabela 2.1, estão listados alguns materiais lignocelulósicos utilizados para produção de etanol bem como sua respectiva composição química em porcentagem de matéria seca.

- **A palha de arroz e o bagaço de malte**

A palha de arroz é uma importante matéria-prima para a produção de etanol e, de acordo com Balat, Balat e Oz (2008), é o resíduo lignocelulósico produzido em maior abundância no mundo, em média 731 milhões de toneladas anualmente, o que potencialmente poderia gerar 205 bilhões de litros de etanol por ano.

Tabela 2.1 - Composição química parcial em porcentagem de matéria seca para diferentes materiais lignocelulósicos.

Biomassa	Composição da massa seca (%)			Referências
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Cavacos de eucalipto	42.6	19.6	28.3	Wei, Wu e Liu, 2012
Bagaço de cana	44	22	22	Chang, Nagwanie e Holtzaple, 1998
Palha de trigo	35,6	28,2	15,1	Qi, Chen e Wan, 2010
“<i>Giant reed</i>”	33.85	25.61	24.02	Shatalov e Pereira, 2012
Palha de arroz	43	23	10,2	Singh e Bishnoi, 2012
Palha de arroz	45	21	18	Hasmann et al., 2008
Bagaço de malte de cevada	16,8	28,4	27,8	Mussatto et al., 2007

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), o arroz, bem como o milho e a soja, são as principais culturas de cereais, leguminosas e oleaginosas produzidas no Brasil e, juntas, respondem por 92,2% da produção da safra nacional para este grupo de culturas. A primeira estimativa de produção de cereais, leguminosas e oleaginosas para 2013 é de que se atinja a ordem de 183,3 milhões de toneladas, um valor 13,1% superior ao obtido em 2012 (161,1 milhões de toneladas). Para o arroz em casca, especificamente, espera-se uma produção da ordem de 12 milhões de toneladas em uma área plantada de 2,4 milhões de hectares, dados que representam aumentos de 5,3% e 0,1% em relação à safra de 2012. O rendimento médio esperado é, portanto, de 4.988 kg/ha, um valor 3,9% superior ao da safra anterior. No estado do Rio Grande do Sul, maior produtor de arroz no Brasil com 67% da produção nacional, a estimativa é de que haja o segundo maior rendimento já registrado na história,

com 7.529 kg/ha. Isto se deve à recuperação dos preços do produto em relação à safra anterior e ao prognóstico de tempo seco em janeiro e fevereiro, o que é favorável ao desenvolvimento da cultura do arroz. Tendo em vista que para cada tonelada de arroz colhido são deixadas aproximadamente 1,35 toneladas de palha no campo (KADAM; FORREST; JACOBSON, 2000), a estimativa para o ano de 2013, com base nas previsões apresentadas, é de que sejam produzidos 16,17 milhões de toneladas de palha de arroz como subproduto agrícola no Brasil.

O estado de São Paulo foi o maior produtor de arroz em casca da região sudeste em 2012, com uma produção da ordem de 82 mil toneladas, o que representou 0,7% da produção nacional. Em 2013, a estimativa de janeiro é de que haja uma produção de 73.950 toneladas, o que representa 0,6% da produção nacional, a maior da região sudeste (IBGE, 2013a). As regiões de Pindamonhangaba e Guaratinguetá detiveram a maior parte da produção de arroz do estado de São Paulo em área cultivada em 2007/2008, como se observa na Figura 2.6 (SÃO PAULO, 2008). No Vale do Paraíba, a área plantada com este cereal atingiu 16 mil hectares em 2010, o que corresponde a 20% da área agricultável desta região (AGRONLINE, 2010).

Outra importante fonte de matéria prima para produção de etanol é o bagaço de malte, um subproduto proveniente do processo de maltagem da cevada para produção de cerveja. A composição química do bagaço de malte pode variar em função da variedade de cevada utilizada, do momento de colheita, do processo de maltagem bem como da presença de adjuntos como milho e trigo adicionados durante a produção de cerveja. O processo que leva à formação do bagaço de malte, bem como as características e potenciais aplicações deste material foram revisados por Mussatto, Dragone e Roberto (2006).

Segundo Huige (2006), durante a produção de cerveja, é inevitável a formação de resíduos e subprodutos deste processo, sendo que o bagaço de malte é o mais abundante entre eles. De acordo com o Sindicato Nacional de Cerveja (SINDICERV), em 2010 o Brasil se tornou o terceiro maior produtor mundial de cerveja, com uma marca anual de 12,6 bilhões de litros. Esta produção é menor apenas que a da China (40 bilhões de litros) e dos Estados Unidos (35 bilhões de litros) (BARROS, 2011). De acordo com Huige (2006), o volume de bagaço de malte gerado por barril de cerveja produzida é dependente da quantidade de malte e de grãos adjuntos os quais são utilizados no processo

de produção de cerveja, bem como da eficiência da cervejaria. Santos e Ribeiro (2005), com base em dados ambientais do Canadá e dos Estados Unidos, estimaram uma geração de 14 a 20 kg de bagaço de malte para cada 100 litros de cerveja produzida, o que leva a uma produção anual de bagaço no Brasil situada entre 1,8 e 2,5 bilhões de kg.

Figura 2.6 - Mapa da produção agrícola de arroz no Estado de São Paulo na safra 2007/2008 (SÃO PAULO, 2008).

Diante da oferta de bagaço proveniente da indústria cervejeira, destacam-se algumas potenciais aplicações. Este material pode ser empregado como fonte de proteínas na nutrição animal, por conter um teor proteico superior a 20%, e para esta finalidade é utilizado na forma de grãos úmidos ou secos. Há ainda relatos na literatura da utilização do bagaço de malte como adjunto na alimentação humana, em biscoitos e pães, devido aos benefícios do seu alto teor de fibras e de proteínas (ÖZTÜRK, et al., 2002; FINLEY; HANAMOTO, 1980). Com relação a processos de bioconversão, o bagaço de malte tem sido utilizado para a produção de xilitol por micro-organismos (MUSSATTO; ROBERTO, 2005)

e também tem sido identificado como uma fonte valiosa de biomassa com potencial para a produção de bioetanol (WHITE; YOHANNAN; WALKER, 2008).

A utilização dos materiais lignocelulósicos para produção de etanol exige uma etapa de hidrólise para liberação dos açúcares a fim de que ocorra a fermentação. Quando há interesse na fermentação de celulose, o processo utilizado é a hidrólise enzimática desta fração para liberar glicose. As enzimas utilizadas são as celulasas, uma classe de enzimas que incluem endoglucanase (EC 3.2.1.4), celobiodrolase (EC 3.2.1.91) e celobiase (β -glucosidase, EC 3.2.1.21). Estas enzimas individualmente tem a capacidade de reduzir o grau de polimerização da celulose, mas é o efeito sinérgico que promove a liberação dos monômeros de glicose (CAO; TAN, 2002). Com a finalidade de melhorar a eficiência de hidrólise enzimática, é preciso remover a fração hemicelulósica bem como a lignina, para facilitar o acesso das enzimas hidrolíticas (MUSSATTO et al., 2008a).

Além do teor de hemicelulose e lignina, fatores como concentração enzimática, concentração de substrato e velocidade de agitação do material durante a reação também tem impacto sobre a eficiência da hidrólise enzimática, sendo a concentração enzimática a variável mais expressiva na hidrólise de bagaço de malte de cevada (MUSSATTO et al., 2008b).

Pelo fato de ser a porção mais abundante nas diversas fontes de biomassa, a celulose ganha destaque nos esforços para a produção de etanol. No entanto, a obtenção de um processo economicamente viável a partir destas fontes alternativas requer não somente a utilização da fração celulósica como também das outras, como hemicelulose. Estudos apontaram reduções de até 25% no custo do galão de etanol derivado de materiais lignocelulósicos por meio da utilização da xilose presente no material (HINMAN et al., 1989). Quando há interesse na utilização da fração hemicelulósica, os materiais lignocelulósicos são submetidos a processos de hidrólise, normalmente químicos, que promovam a solubilização seletiva da hemicelulose, cujas pentoses liberadas também podem ser fermentadas a etanol. Os tratamentos utilizados para o fracionamento destes materiais tem importância significativa no restante do processo, inclusive econômica, pois definem a extensão e o custo da conversão dos carboidratos da celulose e da hemicelulose em etanol (BALAT; BALAT; OZ, 2008). A hemicelulose é mais susceptível à hidrólise quando comparada à celulose por não apresentar

estrutura altamente cristalina, além de ser ramificada (PARAJO; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998).

- **Hidrólise ácida**

A hidrólise com ácido diluído normalmente tem pouco impacto sobre a lignina e celulose, mas solubiliza a fração hemicelulósica. Neste método podem ser empregados ácidos minerais como HCl e H₂SO₄ diluídos, e pode ser realizado em uma única etapa em temperaturas apropriadas (BINOD et al., 2010). Durante este processo, são liberados não somente açúcares solúveis da fração hemicelulósica, como também produtos de degradação dos mesmos em concentrações variáveis, as quais dependem do tipo e da severidade do tratamento de hidrólise, o que envolve condições de concentração do ácido, alta temperatura e pressão. Estes compostos são tóxicos aos micro-organismos que realizam a fermentação dos açúcares liberados em etanol, por isso é necessária a escolha adequada das condições do processo (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGRAM, 2000; ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2003; KELLY et al., 2008). Entre estes compostos, estão o furfural e o hidroximetilfurfural originados da desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente, o ácido acético liberado pela hidrólise de acetil-xilanas, bem como compostos aromáticos derivados da lignina (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGRAM, 2000).

O principal mecanismo molecular de hidrólise ácida, segundo Fengel e Wegener (1984), ocorre em três passos. Primeiramente, o próton do ácido catalisador interage rapidamente com o oxigênio glicosídico que liga duas unidades de açúcar (a), formando um ácido conjugado (b). Após este passo, ocorre uma lenta quebra da ligação C-O, e há formação de um intermediário cíclico, um carbocátion (c). O carbocátion finalmente inicia a adição rápida de uma molécula de água, o que resulta em um produto final estável e liberação do próton. Alternativamente, a protonação pode ocorrer no oxigênio do anel (b'), o que promove a abertura do anel e formação de um carbocátion não-cíclico. No entanto, a maior probabilidade é de que haja formação do intermediário cíclico. Este mecanismo está representado na Figura 2.7.

2.3. Produção de etanol a partir de xilose: aspectos gerais

A bioconversão de xilose em etanol requer sistemas enzimáticos específicos. Na maioria das bactérias, o processo de conversão da xilose em xilulose ocorre em um passo único, catalisado pela enzima xilose isomerase (XI). A desvantagem da utilização de bactérias com este fim é o aparecimento de subprodutos indesejáveis bem como a frequente baixa tolerância ao etanol (BRUINENBERG et al., 1984; AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

Figura 2.7 - Mecanismo de hidrólise ácida de ligações glicosídicas (FENGEL; WEGENER, 1984).

Já nas leveduras e maioria dos fungos filamentosos, a via de conversão de xilose a etanol envolve duas reações iniciais catalisadas por oxidoredutases, dependentes de cofatores carreadores de elétrons. A primeira enzima é a xilose redutase (XR), responsável pela conversão de xilose em xilitol e dependente de NADPH na maioria das leveduras. A segunda, xilitol desidrogenase (XDH), é dependente do cofator NAD⁺ e catalisa a reação de oxidação do xilitol a xilulose. Esta especificidade de cofatores faz com que estas leveduras acumulem xilitol em condições de baixa aeração, pois a conversão de xilose em intermediários da via glicolítica leva a uma superprodução de NADH que bloqueia as atividades metabólicas, pois não pode ser reoxidada em NAD⁺ na ausência de oxigênio (BRUINENBERG et al., 1984; AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

No entanto, existem algumas poucas leveduras, como *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus*, cuja enzima xilose redutase apresenta afinidade tanto por NADPH quanto por NADH. O grande benefício da possibilidade de utilização

de NADH pela enzima XR é o balanço total de cofatores quando NADH é utilizado preferencialmente em relação ao NADPH em condições de baixa aeração, permitindo a produção de etanol em detrimento do subproduto xilitol. A razão entre as atividades de xilose redutase ligada a NADH e NADPH é ainda maior para *Pichia stipitis* quando comparada a *Pachysolen tannophilus*, o que leva a maior produção de etanol por esta levedura e a níveis de eficiência de conversão de 75%, enquanto *Pachysolen tannophilus* atinge apenas 25% (BRUINENBERG et al., 1984).

Na Figura 2.8 há a representação esquemática das vias responsáveis pela entrada da xilose no metabolismo fermentativo de diferentes micro-organismos e na Figura 2.9 estão representadas esquematicamente as vias metabólicas pelas quais as moléculas de xilose e glicose são convertidas a etanol.

O estudo do genoma da levedura *Pichia stipitis* permite melhor conhecimento sobre sua biologia, metabolismo e regulação, e também pode ser usado como ferramenta no desenvolvimento de leveduras geneticamente modificadas para fermentação da xilose. Os genes que codificam enzimas envolvidas na assimilação de xilose, via das pentoses fosfato oxidativa, glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e produção de etanol são isoformas semelhantes àqueles encontrados em outras leveduras. No entanto, os níveis de expressão desses genes são influenciados pelas condições ambientais, como ausência ou presença de oxigênio, glicose e xilose. Os genes que codificam as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, envolvidos na assimilação de xilose, não são expressos na presença de glicose no meio de cultivo. Já a presença de xilose induz a expressão de genes relacionados à via das pentoses fosfato, o que indica que esta via tem sua atividade aumentada para metabolizar este açúcar. *Pichia stipitis* apresenta ainda diversos genes envolvidos em reações de oxidorredução utilizando NADP(H), o que sugere que a levedura pode utilizar diversas estratégias para manter o balanço dos cofatores NAD e NADP, o que não acontece em leveduras as quais não utilizam xilose naturalmente. Nestas leveduras, mesmo que geneticamente engenheiradas para consumir xilose, observa-se que é gerado NADH em excesso ao crescê-las em meio de cultura com esta pentose, o que não acontece com a levedura *P. stipitis*, pois esta possui naturalmente mecanismos para manter o balanço de seus cofatores (JEFFRIES et al., 2007).

Figura 2.8 - Principais mecanismos envolvidos na etapa de conversão de xilose em xilulose para síntese de etanol por micro-organismos, (a) em bactérias, (b) em fungos e leveduras em geral e (c) em *Pichia stipitis*. (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

Figura 2.9 - Esquema das vias metabólicas pelas quais ocorre a conversão de xilose (via das pentoses fosfatadas) e glicose (via glicolítica) a etanol (Adaptado de MATSUSHIKA et al., 2009).

Existem ainda leveduras geneticamente modificadas, produzidas com a finalidade de melhorar o consumo de xilose para produção de etanol em detrimento de xilitol. Alguns exemplos são *Candida utilis* com múltiplas mutações sítio-dirigidas na região responsável pela afinidade por cofator do gene que codifica a xilose redutase (TAMAKAWA; IKUSHIMA; YOSHIDA, 2011), *Saccharomyces cerevisiae* modificada pela inserção de gene responsável por codificar XR fúngica (YU et al., 2011) e XR de *Pichia stipitis* (LEE et al., 2010), *Sacharomyces cerevisiae* modificada pela inserção de XI bacteriana (PARACHIN et al., 2011).

A grande desvantagem da utilização de xilose redutase bacteriana com esta finalidade são as baixas taxas de consumo de xilose. Já a modificação da afinidade de xilose redutase por cofator reduzido muitas vezes não é suficiente para se atingir os níveis de produção de etanol alcançados por *Pichia stipitis*. Isto ocorre porque esta levedura apresenta outros artifícios para prevenir a formação de xilitol além da afinidade da XR por NADH, os quais não estão presentes em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pachysolen tannophilus* ou *Candida utilis* (JEPPSSON; ALEXANDER; HAHNHAGERDAL, 1995).

Entre as leveduras naturalmente fermentadoras de pentoses, *Pichia stipitis* apresenta destaque na produção de etanol devido às suas características metabólicas. Sanchez et al. (2002), estudando a fermentação alcoólica de misturas de xilose e glicose pelas leveduras *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus*, observaram que, entre as leveduras testadas, *P. stipitis* foi aquela que apresentou os melhores resultados quando analisados os parâmetros fermentativos de transformação das misturas de glicose e xilose em etanol. Além disso, esta levedura teve taxas máximas de crescimento específico mais altas na presença de elevadas concentrações iniciais de xilose que de glicose.

A fermentação de xilose com vistas à produção de etanol por *Pichia stipitis* é regulada por diferentes fatores ambientais, incluindo concentração inicial de substrato, temperatura, pH e aeração. Dupreez, Bosch e Prior (1986), observaram que os maiores valores de taxa de crescimento específico e de produtividade de etanol na fermentação de xilose por *Pichia stipitis* foram encontrados na faixa de pH entre 4,0 e 5,5. Os autores também notaram que estes parâmetros fermentativos apresentaram os maiores valores nas temperaturas próximas de 30 °C e foram afetados negativamente com o aumento

da mesma. Embora a levedura tenha demonstrado habilidade de consumir totalmente a xilose do meio de cultura mesmo em elevadas concentrações iniciais (90 g.L^{-1}), a melhor produtividade volumétrica em etanol foi obtida quando a concentração inicial foi de 50 g.L^{-1} . Não foi detectado acúmulo de xilitol durante as fermentações.

Grootjen, Vanderlans e Luyben (1990), ao estudarem os efeitos da composição do meio e da aeração sobre o metabolismo de *Pichia stipitis* CBS 5773 na presença de misturas de xilose e glicose para a produção de etanol, constataram que a adição de extrato de levedura ao meio tem um efeito positivo sobre o crescimento da levedura. Quanto à aeração, os autores observaram a existência de uma relação linear positiva entre o consumo de oxigênio e a produção de biomassa a partir de glicose e xilose, e esta relação é limitada, pois a cultura apresenta um valor máximo para o consumo de O_2 , sugerindo que a capacidade oxidativa da levedura é limitada. A produção de etanol utilizando tanto glicose quanto xilose como substratos decai linearmente à medida que o consumo de oxigênio pela levedura é aumentado e, de fato, os autores constataram que há uma correlação linear negativa entre a produção de etanol a partir de ambos os substratos e o consumo de oxigênio. Desta forma, os autores concluíram que a melhor condição ambiental para a conversão dos açúcares a etanol é aquela na qual o fornecimento de O_2 é mínimo.

Em estudos sobre as melhores condições de transferência de oxigênio na fermentação de misturas de açúcares a etanol por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 em reator tipo tanque agitado, Silva et al. (2011) variaram valores de coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}) entre 0,7 e $12,1 \text{ h}^{-1}$. Os autores utilizaram como substrato os açúcares xilose (90 g.L^{-1}), glicose (15 g.L^{-1}) e arabinose (15 g.L^{-1}), comuns em hidrolisados hemicelulósicos e foi observado que, de modo geral, o crescimento celular foi favorecido pelo aumento do valor de k_{La} , enquanto a produção de etanol foi prejudicada por este aumento, sendo que no maior valor de k_{La} foi observada a menor produção de etanol. Entre os valores de k_{La} avaliados, os autores constataram que o ensaio fermentativo no qual houve aeração intermediária (k_{La} de $4,9 \text{ h}^{-1}$) foi o que melhor favoreceu a conversão de xilose a etanol, e sugeriram que condições microaeróbias são as mais adequadas para uma ótima produção de etanol.

Silva et al. (2012) avaliaram a influência da composição do meio de fermentação sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 utilizando xilose como principal substrato. Os autores estudaram o efeito de adição de uréia, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e extrato de levedura ao meio e fermentação por meio de delineamento experimental. Entre os nutrientes testados, o extrato de levedura se mostrou como sendo o mais importante para a produção de etanol por *P. stipitis*, tendo em vista que não houve produção alguma de etanol nos ensaios em que este nutriente não foi adicionado, além de ter sido observado baixo consumo do substrato. Os autores observaram ainda que o ensaio no qual foram acrescentados os três nutrientes nas maiores concentrações testadas forneceu a maior produção de etanol, o que indica que a fermentação é afetada não somente pela presença ou ausência dos compostos avaliados como também pela sua concentração.

Em fermentações empregando os hidrolisados de biomassa lignocelulósica por *Pichia stipitis*, além dos parâmetros ambientais citados, existem outros fatores que afetam a produção de etanol. Estes fatores são decorrentes da complexidade química dos hidrolisados, e incluem substâncias tóxicas liberadas durante o processo de hidrólise das matérias primas, as quais podem inibir o crescimento celular e a produção de etanol por micro-organismos. No item a seguir, serão abordados compostos com potencial inibitório ao metabolismo microbiano.

2.4. Principais compostos inibidores do metabolismo microbiano gerados durante o processo de hidrólise com ácido diluído

A natureza e a quantidade de compostos inibitórios presentes nos hidrolisados hemicelulósicos é dependente da matéria prima e do procedimento de hidrólise utilizado, e estes compostos podem ser classificados em grupos de acordo com sua origem, sendo alguns deles (1) substâncias liberadas pelo processo de hidrólise, como o ácido acético proveniente da estrutura hemicelulósica, (2) substâncias produzidas como subprodutos de degradação de açúcares, como furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido levulínico, ácido fórmico, (3) produtos de degradação da lignina, originados do processo de hidrólise, os quais incluem compostos aromáticos e poliaromáticos com substituintes variados (OLSSON; HAHNHAGERDAL, 1996).

Guo et al. (2008), avaliaram o efeito do tempo de hidrólise (10 a 180 minutos) e da concentração da solução de H_2SO_4 empregada (1, 2 e 3% m/m) sobre a taxa de liberação de glicose, arabinose e xilose, bem como sobre a formação dos inibidores furfural e ácido acético na hidrólise de “*silvergrass*”, palha de arroz e bagaço de cana, mantendo a relação sólido líquido em 1:20 e a temperatura a 121°C. Para avaliar o efeito conjunto destes parâmetros sobre a liberação dos compostos supracitados, o autor adotou o cálculo do fator de severidade combinada, o qual relaciona em uma única variável os efeitos do tempo de hidrólise, temperatura e concentração de ácido, e pode ser definido pela equação 2.1.

$$CSF = \log \left\{ t \cdot \exp \left[\frac{(t_H - t_R)}{14,75} \right] \right\} - pH \quad (\text{Equação 2.1})$$

Onde:

t = tempo de hidrólise em minutos

T_H = temperatura de hidrólise em °C

T_R = temperatura de referência, normalmente 100°C

pH = acidez da solução aquosa em termos de concentração de ácido

Neste trabalho, os autores observaram que a liberação de glicose e arabinose (da celulose e hemicelulose, respectivamente) aumentou à medida que a severidade do tratamento de hidrólise cresceu. Os autores também obtiveram altos rendimentos na liberação de xilose para a palha de arroz quando comparada às outras duas biomassas nas diversas condições testadas, sendo que a liberação se tornou maior com o aumento da severidade do tratamento químico de 0,92 para 2,0 atingindo um máximo de 90% e, em seguida, diminuiu com o aumento da severidade para 2,3. Este decréscimo foi atribuído à degradação de xilose em furfural, pois a presença deste composto foi detectada apenas nos tratamentos mais severos. A produção de ácido acético foi também aumentada com a elevação da severidade do tratamento, e atingiu um valor de 90% de liberação nos tratamentos com severidade a partir de 2,0.

Hsu et al. (2010), ao estudarem condições de hidrólise de palha de arroz com H_2SO_4 diluído, observaram que as condições nas quais há maior liberação

de xilose da hemicelulose contida na palha são aquelas nas temperaturas de 160 °C e 180 °C, em uma faixa de severidade entre 1,7 e 2,0. Nestas condições, o rendimento de hidrólise atingiu 89%. Eles também constataram que, quando a temperatura é aumentada para 190 °C, o rendimento em xilose cai drasticamente, devido à sua degradação a furfural. A liberação de glicose da celulose foi maior à medida que a severidade da hidrólise aumentou, mas não ultrapassou 23%. Os autores detectaram a presença de furfural e 5-hidroximetilfurfural após tratamentos de severidade superior a 1,9 a 190 °C, provenientes da degradação de pentoses e hexoses, respectivamente, bem como de ácido acético, originado da liberação dos grupos acetil das acetil-xilanas da palha de arroz.

Roberto, Mussatto e Rodrigues (2003) avaliaram o efeito da concentração de H_2SO_4 e do tempo de reação durante o processo de hidrólise de palha de arroz com ácido diluído sobre as concentrações dos açúcares liberados (glicose, xilose e arabinose) bem como dos subprodutos de degradação (furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético). De acordo com os autores, a concentração de glicose e xilose foi dependente das condições operacionais utilizadas, enquanto a concentração de arabinose liberada se manteve inalterada em um valor próximo ao máximo disponível em função da composição em arabinana da palha de arroz. A condição de hidrólise que forneceu maior recuperação de xilose ($20,5 \text{ g.L}^{-1}$) e glicose ($6,3 \text{ g.L}^{-1}$) foi alcançada com 1,6% de H_2SO_4 por 30 minutos, em uma temperatura de 121 °C. Nesta condição, foram obtidos os mais altos níveis de furfural ($0,13 \text{ g.L}^{-1}$) e hidroximetilfurfural ($0,18 \text{ g.L}^{-1}$) os quais tiveram seus níveis aumentados com o aumento da concentração de ácido e do tempo de reação. Em contrapartida, as concentrações de ácido acético se mantiveram em torno de 2 g.L^{-1} , independentemente do tratamento empregado. Como o sucesso da fermentação está aliado não somente à liberação de açúcares da hemicelulose como também a um ambiente livre de inibidores para o micro-organismo fermentativo, a condição na qual houve maior liberação de açúcares não foi escolhida como ideal para hidrólise da palha de arroz. A condição estimada como ideal por meio de modelagens estatísticas foi de 121°C, 1,0% de ácido sulfúrico por um período de 27 minutos. De fato, nestas condições experimentais os autores obtiveram 77% de liberação da xilose contida no material, o valor máximo esperado de acordo com a modelagem proposta, bem como menor liberação de produtos de degradação de açúcares, como furfural e 5-hidroximetilfurfural.

A seguir, são apresentados os principais compostos com potencial inibitório para o metabolismo fermentativo de micro-organismos liberados durante o processo de hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos. Entre estes compostos, encontram-se ácidos fracos alifáticos, compostos derivados da degradação de açúcares, e compostos fenólicos.

2.4.1. Ácidos orgânicos alifáticos fracos

Os ácidos podem ser classificados como fortes ou fracos em função do seu pK_a , que é o logaritmo negativo da sua constante de dissociação, K_a . O parâmetro pK_a corresponde a um valor de pH no qual os ácidos fracos apresentam poder tamponante, pois encontram-se 50% na sua forma protonada e 50% na sua forma desprotonada. A equação 2.2, de Henderson-Hasselbach, define que as concentrações relativas das formas dissociada e não dissociada são uma função do pH, e a concentração da forma não dissociada do ácido aumenta com a diminuição do pH (LAWFORD; ROUSSEAU, 1993; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (\text{Equação 2.2})$$

Onde:

$[A^-]$ = concentração do ácido fraco na sua forma dissociada

$[AH]$ = concentração do ácido fraco na sua forma não dissociada

Os ácidos orgânicos derivados dos pré-tratamentos da biomassa vegetal afetam negativamente o crescimento de micro-organismos, como por exemplo, a bactéria *Escherichia coli*, o que pode acarretar numa redução da conversão e da produtividade do processo fermentativo (MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

Diversos ácidos orgânicos são formados durante o pré-tratamento da biomassa, entre eles o ácido acético derivado de acetilxilanas e outros como o ácido fórmico e ácido levulínico, provenientes da degradação de açúcares. As concentrações destes compostos nos hidrolisados dependem do tipo de matéria prima utilizada e do pré-tratamento empregado e, tipicamente, as concentrações

de ácido acético são as maiores encontradas quando comparadas aos outros ácidos orgânicos (MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

2.4.1.1. **Ácido acético**

O ácido acético (Figura 2.10) está presente no hidrolisado hemicelulósico de materiais lignocelulósicos como consequência da hidrólise dos grupos acetil da hemicelulose, e sua presença é observada à medida que há liberação de xilose (GUO et al., 2008).

Figura 2.10 – Representação da molécula de ácido acético, MM=60,05 g.mol⁻¹ (MERCK, 1983).

O efeito inibitório do ácido acético parece incidir, primariamente, sobre o crescimento celular, não sendo tão expressivo no que diz respeito à produção de etanol. Este efeito é dependente do pH, pois sua forma não dissociada, ou seja, aquela predominante quando o pH do meio é inferior ao valor de pK_a do ácido (pK_a = 4,75 para o ácido acético), é capaz de penetrar na membrana celular, tendo em vista que a forma não carregada dos ácido fracos é solúvel nos lipídeos da membrana. Uma vez em seu interior, o ácido dissocia-se liberando um próton e um ânion, pois o pH intracelular é aproximadamente neutro, ou seja, é naturalmente maior que o pK_a do ácido. Estes agentes desacopladores rompem o potencial transmembrana da célula, pois um próton efetivamente atravessa a membrana sem a criação de ATP. Além disso, este processo promove uma queda no pH citoplasmático, o que interfere nos mecanismos de homeostase relacionados à manutenção do pH intracelular constante, inibindo o crescimento e o metabolismo. A dependência do efeito inibitório do ácido acético em relação ao pH é explicada pelo fato que, se o pH externo for menor que o pK_a do ácido, então ele existirá em maiores concentrações na forma não dissociada, facilitando

sua entrada na célula através da membrana (LAWFORD; ROUSSEAU, 1993; OLSSON; HAHNHAGERDAL, 1996; MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

O ânion liberado no interior da célula após a dissociação do ácido fraco também apresenta efeito inibitório na medida em que seu acúmulo no interior da célula pode causar aumento na pressão de turgor (MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

A tolerância do micro-organismo fermentativo em relação ao ácido acético pode ser maximizada por meio do controle do pH durante a fermentação. Como o ácido é capaz de entrar na célula quando está na sua forma não dissociada, a manutenção de um pH superior ao pK_a do ácido diminuiria a concentração da espécie tóxica no meio. Este controle deve ser feito em concordância com o valor de pH no qual o micro-organismo exibe sua melhor performance fermentativa em termos de conversão e produtividade (LAWFORD; ROUSSEAU, 1993). O controle do pH da fermentação é um parâmetro crucial para o sucesso do processo, pois baixos valores de pH durante o cultivo inibem o crescimento do micro-organismo e diminuem a viabilidade celular mesmo na ausência de ácidos fracos, pois há uma ampliação do gradiente de prótons através da membrana, o que promove um aumento na entrada passiva de prótons para o citoplasma (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Existem mecanismos metabólicos descritos para *Saccharomyces cerevisiae* envolvidos na tolerância ao *stress* ácido. De acordo com a teoria do desacoplamento, a ação de uma ATPase de membrana neutraliza a mudança de pH intracelular por meio do bombeamento dos prótons para o exterior da célula com gasto de ATP. Para que este mecanismo funcione e o pH intracelular se mantenha neutro, é necessário que seja gerado mais ATP, o que ocorre por meio do aumento da produção de etanol em condições de baixa aeração em detrimento da formação de biomassa. Se as concentrações de ácido forem muito altas, a capacidade de bombeamento de prótons é esgotada, consumindo todo o ATP da célula, dissipando a força próton motora e acidificando o citoplasma (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Na Figura 2.11 está representado esquematicamente o mecanismo de entrada do ácido acético na forma não dissociada na célula bem como sua atuação como inibidor.

Díaz et al. (2009) observaram que a presença do ácido acético no meio de fermentação em pH 4,5 com 20 g.L⁻¹ de glicose e 15 g.L⁻¹ de xilose afetou o metabolismo da levedura *Pichia stipitis*, mesmo na menor concentração utilizada (3 g.L⁻¹). Nestas condições, a velocidade específica de crescimento da levedura foi de 0,06 h⁻¹, um valor 64,7% menor que aquele obtido para o controle sem a presença do inibidor. Em contrapartida, os autores relataram que, quando o ácido acético está em concentrações que não inibem totalmente o crescimento da levedura, ele promove um aumento no fator de conversão de substrato em etanol, mas com queda na produtividade em relação ao controle.

Figura 2.11 - Atuação do ácido acético como inibidor no interior da célula de micro-organismos. (Adaptado de LAWFORD; ROUSSEAU, 1993; MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

Bellido et al. (2011), avaliaram o efeito do ácido acético variando sua concentração de 0,5 g.L⁻¹ a 3,5 g.L⁻¹ na fermentação alcoólica por *Pichia stipitis*, usando 35 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de xilose. O pH do meio de fermentação foi mantido em 5,0 por meio do uso de tampão. O ácido acético na concentração de 3,5 g.L⁻¹ inibiu completamente tanto o crescimento da levedura quanto a produção de etanol. O consumo de xilose foi mais afetado pela presença do ácido acético do que o consumo de glicose, e este efeito se tornou mais pronunciado à medida que a concentração do ácido aumentou. Por exemplo, a levedura não conseguiu consumir toda a glicose presente no meio quando as concentrações de ácido

acético foram maiores ou iguais a $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ e não conseguiu consumir toda a xilose em nenhuma das concentrações de ácido usadas, mesmo após 168 horas de fermentação. Os autores também verificaram que o crescimento celular decresceu acentuadamente, atingindo menos que 50% em relação ao controle em concentrações acima de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$. Quanto ao etanol, quando as condições de ácido presentes no meio foram de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,5 \text{ g.L}^{-1}$, a produção obtida foi de 79,95%, 76,7% e 45,6%, respectivamente, em relação ao controle, no qual foram atingidos $22,8 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol. Já o fator de conversão de açúcares em etanol foi maior na presença do ácido acético quando comparado com o controle, pois apesar de ter produzido menor quantidade de etanol, esta produção se deu com menor consumo de açúcares.

Delgenes, Moletta e Navarro (1996), ao avaliarem a influência do ácido acético ($5 - 15 \text{ g.L}^{-1}$) na fermentação alcoólica por *Candida shehatae* e *Pichia stipitis* a partir de xilose (20 g.L^{-1}) em pH inicial de 5,6, observaram que houve inibição na produção de etanol e que esta foi dependente do micro-organismo utilizado. Na concentração de 15 g.L^{-1} de acetato, os autores encontraram produções de etanol de 64% e 25% em relação ao controle para *C. shehatae* e *P. stipitis*, respectivamente. Já o crescimento nestas concentrações foi de 79% e 64% em relação ao controle para *C. shehatae* e *P. stipitis*, respectivamente. O efeito inibitório do ácido acético foi mais pronunciado para a produção de etanol que para o crescimento das leveduras.

2.4.2. Compostos furanos

Os furanos estão presentes no hidrolisado hemicelulósico de materiais lignocelulósicos como consequência da degradação de pentoses e hexoses durante o pré-tratamento com ácido diluído (OLSSON; HAHNHAGERDAL, 1996). Reações de desidratação ocorrem durante tratamentos térmicos dos polissacarídeos, como a hidrólise com ácido diluído das biomassas vegetais, e são reações difíceis de se evitar sob condições ácidas, causando decomposição dos açúcares (FENGEL; WEGENER, 1984).

A desidratação catalisada por ácido em condições brandas leva à formação de anidro-açúcares com ligações glicosídicas intramoleculares, resultantes da liberação de uma molécula de água de dois grupos hidroxil. Vários produtos de

degradação podem ser formados a partir destas moléculas, pois as ligações glicosídicas podem ser hidrolisadas com facilidade. Entre estes produtos encontram-se compostos aromáticos e condensados. Os mais importantes produtos de degradação formados são os compostos cíclicos furfural (2-furaldeído), originado de pentoses e ácidos urônicos, e hidroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furaldeído, HMF), gerado a partir de hexoses, principalmente a glicose (FENGEL; WEGENER, 1984). A formação destes compostos em decorrência do tratamento ácido está representada esquematicamente na Figura 2.12.

Figura 2.12 - Formação de furfural, hidroximetilfurfural, ácido levulínico e ácido fórmico a partir de monossacarídeos em meio ácido. Adaptado de Fengel e Wegener (1984) e Palmqvist e Hahn-Hagerdal (2000).

Por serem compostos hidrofóbicos, os furanos podem causar danos à membrana citoplasmática e, principalmente, afetar sítios hidrofóbicos no interior da célula (MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009). Shahabuddin, Rahman e Hadi (1991) demonstraram que os compostos furanos apresentam a capacidade de quebrar segmentos de DNA, causando mutações. A afinidade destes compostos pelo ácido nucleico se dá principalmente em regiões ricas em adenina e timina. Além disso, estes compostos atuam no metabolismo da célula a níveis enzimáticos. A

Figura 2.13 representa esquematicamente a ação do furfural, bem como do HMF, na célula.

A presença dos compostos furanos em meios de fermentação promove um aumento na duração da fase *lag* de crescimento, o qual é dependente do tipo de micro-organismo e da concentração do composto no meio. Este comportamento sugere que as células desviam o seu metabolismo a fim de se adaptar ao stress químico promovido pela presença dos furanos e, então, conseguem reestabelecer o seu crescimento (LIU et al., 2004).

Figura 2.13 - Ação dos compostos furanos como inibidores nas células de micro-organismos (Adaptado de MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

De acordo com LIU (2011), leveduras tolerantes à presença de furanos mostraram-se capazes de convertê-los em compostos menos tóxicos como furanometanol, a partir de furfural, e furano-2,5-dimetanol, a partir de 5-hidroximetilfurfural, reestabelecendo taxas de conversão de substrato a etanol normais. A identificação destes produtos de degradação sugere que o grupo aldeído é o responsável pela toxidez destes compostos à levedura, e não o anel furano em si. O mecanismo bioquímico que caracteriza o metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes envolve um perfil de expressão de proteínas

diferente daquele apresentado por micro-organismos susceptíveis, com níveis enzimáticos diferenciados nas vias glicolítica e das pentoses fosfatadas. Estas vias centrais são intimamente relacionadas devido ao metabolismo de glicose, e a presença de furfural e HMF reprime enzimas importantes, o que provoca um crescimento deficitário da levedura. A superexpressão da glicose-6-fosfato desidrogenase, por exemplo, enzima responsável por um passo precoce na via, é importante para o deslocamento do metabolismo de glicose da via glicolítica para a via das pentoses fosfatadas. Essa mudança promove um aumento da regeneração de NAD(P)H, o qual deve ser utilizado para a redução do acetaldeído, furfural e HMF. Este perfil implica em um balanço redox adequado dependente de NAD(P)H/NAD(P)⁺, o que permite que a levedura realize a transformação do furfural e do HMF em compostos reduzidos menos tóxicos bem como a conversão de acetaldeído a etanol.

Ask et al. (2013) estudaram o efeito do furfural e do HMF sobre o balanço redox de *Saccharomyces cerevisiae* VTT C-10883, uma levedura com modificações genéticas entre as quais se encontram a adição dos genes responsáveis por codificar as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Pichia stipitis* e, portanto, capaz de utilizar xilose como fonte de carbono e energia. Os autores observaram, por meio de um processo contínuo em condições anaeróbias, que a adição ininterrupta de HMF e furfural em uma razão de 2,3:1 ao meio quando a cultura atingiu o estado estacionário provocou uma redução nas concentrações de NADH e NADPH intracelulares quando comparados ao controle cuja alimentação não continha inibidores. Os autores sugeriram que a perturbação do sistema redox pode constituir o mecanismo molecular de ação destes compostos sobre o metabolismo da levedura.

A Figura 2.14 representa a via de conversão do furfural em 2-furanometanol acoplada à oxidação de NADH/NADPH e catalisada por múltiplas redutases, bem como a redução do HMF a furano-2,5-dimetanol.

Figura 2.14 - Diagrama esquemático demonstrando a redução de furfural a 2-furanometanol mediada por redutases (a), bem como a conversão de HMF em furano-2,5-dimetanol (b) (LIU et al., 2004; MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

2.4.2.1. *Furfural*

O furfural (Figura 2.15) é o composto furano originado da degradação de pentoses, por meio de um processo de desidratação durante a hidrólise com ácido diluído (FENGEL; WEGENER, 1984).

Figura 2.15 - 2-furaldeído, 2-furancarbaldeído, Furfural, MM = 96,08 g.mol⁻¹ (MERCK, 1983).

O furfural, além de apresentar toxicidade quando sendo o único inibidor presente no meio fermentativo, é também tóxico quando em conjunto com outros inibidores, como o ácido acético e 5-hidroximetilfurfural, devido ao efeito sinérgico (PALMQVIST et al., 1999; BELLIDO et al., 2011).

Micro-organismos tolerantes à presença do furfural são capazes de reduzi-lo por meio da ação de oxidorreduções dependentes de NADPH. Acredita-se que haja um mecanismo competitivo entre a redução do furfural e as reações de biossíntese celular, pois o aumento da fase lag sugere que há diminuição na biossíntese enquanto altas concentrações de NADPH são direcionadas para a redução do furfural a compostos menos tóxicos (MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

Bellido et al. (2011), ao avaliarem o efeito do furfural sobre o metabolismo fermentativo da levedura *Pichia stipitis*, encontraram que este composto possui efeito inibitório sobre o micro-organismo, ainda que não seja tão pronunciado quanto aquele exercido pela presença do ácido acético nas concentrações encontradas na palha de trigo. O furfural promoveu a diminuição na taxa de consumo de açúcares e, consequentemente, na produtividade em etanol e este efeito foi aumentado à medida que a concentração de furfural foi elevada de 0,5 g.L⁻¹ para 2,0 g.L⁻¹. Ao final dos experimentos, não foi detectada a presença do furfural, o que sugere, segundo os autores, que o micro-organismo assimilou este composto antes de iniciar o crescimento e a produção de etanol. Desta forma, maiores concentrações de furfural são as que mais estendem a fase lag da levedura, devido à necessidade de produção de enzimas para assimilação do composto tóxico.

Liu et al. (2004), estudando o efeito do furfural sobre a levedura *Pichia stipitis*, constataram que a levedura apresentou fase lag de aproximadamente 4 horas na presença de 0,96 g.L⁻¹ deste composto, e com o aumento desta concentração para 2,9 g.L⁻¹, a fase lag se estendeu para 24 horas. Foi observada também a formação de álcool furfuril em concentrações proporcionais à concentração inicial do inibidor.

Delgenes, Moletta e Navarro (1996) estudaram os efeitos do furfural nas concentrações de 0,5 g.L⁻¹, 1,0 g.L⁻¹ e 2,0 g.L⁻¹ sobre o crescimento e fermentação de xilose a etanol das leveduras *Pichia stipitis* e *Candida shehatae*. Este composto mostrou efeito inibitório, tanto para o crescimento quanto para a produção de etanol mesmo nas menores concentrações testadas, em um padrão de inibição dependente não apenas das concentrações presentes no meio de fermentação como também do micro-organismo utilizado. O crescimento de *C. shehatae* e *P. stipitis* foi de 9,7% e 1% em relação ao controle, respectivamente,

na presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural. A produção de etanol nesta mesma concentração de inibidor foi de apenas 9,6% e 5% do controle para *C. shehatae* e *P. stipitis*, respectivamente. Segundo os autores, esta inibição pode ser o resultado da ação do furfural em enzimas chave da via glicolítica, como triose fosfato desidrogenase e álcool desidrogenase. Os autores também relataram o consumo do furfural em taxas similares pelas diferentes leveduras testadas.

Em estudos realizados por Modig, Liden e Taherzadeh (2002), foram mensuradas as atividades das enzimas aldeído desidrogenase (AIDH), álcool desidrogenase (ADH) e piruvato desidrogenase (PDH) na presença do furfural em concentrações de até 4 g.L^{-1} . Segundo os autores, as atividades das três enzimas foram afetadas na presença de furfural, principalmente AIDH e PDH, cujas atividades tiveram uma queda de mais de 90% na presença de 1 g.L^{-1} de furfural.

Kelly et al. (2008), ao estudarem o efeito do furfural em concentrações de de $0,5$ a $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ sobre o crescimento de *Candida guilliermondii*, constataram que este composto afetou as taxas de crescimento celular, pois aumentou a fase *lag* de adaptação, cuja duração variou de 0 a 15 horas, dependendo da concentração deste composto no meio de fermentação.

2.4.2.2. **5-Hidroximetilfurfural**

O 5-hidroximetilfurfural (Figura 2.16) é o composto liberado devido à desidratação de hexoses em condições ácidas a elevadas temperaturas. Se as temperaturas são muito elevadas, esta molécula cíclica pode ser convertida a ácido levulínico e ácido fórmico (FENGEL; WEGENER, 1984).

Figura 2.16 - 5-(Hidroximetil)-2-furaldeído, 5-(hidroximetil)-furano-2-carboxaldeído, 5-(hidroximetil)-2-furfural, HMF, $\text{MM}=126.11 \text{ g.mol}^{-1}$ (MERCK, 1983).

O efeito inibitório do HMF é semelhante àquele causado pelo furfural, pois também é observado aumento na fase *lag* de crescimento do micro-organismo, apesar de ser menos tóxico (BELLIDO et al., 2011; ZALDIVAR; MARTINEZ;

INGRAM, 1999). A concentração de HMF nos hidrolisados hemicelulósicos é tipicamente menor quando comparada à de furfural, pois há baixo teor de hexoses na hemicelulose e as condições empregadas nos pré-tratamentos com ácido diluído não são severas o suficiente para degradar grandes quantidades de hexoses, além do fato que o HMF é um composto altamente reativo (MUSSATO; ROBERTO, 2004).

Modig, Liden e Taherzadeh (2002), ao estudarem o efeito do HMF em até $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ sobre as atividades das enzimas aldeído desidrogenase (AIDH), álcool desidrogenase (ADH) e piruvato desidrogenase (PDH) observaram que este composto inibe as atividades das três enzimas, principalmente a ADH, que praticamente não apresentou atividade em concentrações superiores a $1,26 \text{ g.L}^{-1}$. As enzimas ADH e AIDH foram menos afetadas pela presença deste composto, e mantiveram por volta de 40% de suas atividades em relação ao controle mesmo na maior concentração de HMF testada.

Delgenes, Moletta e Navarro (1996) avaliaram a influência de HMF sobre o crescimento e produção de etanol a partir de xilose por *Candida shehatae* e *Pichia stipitis*, e observaram ambos foram inibidos por HMF nas concentrações testadas ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$, $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $5,0 \text{ g.L}^{-1}$). A inibição cresceu com o aumento da concentração do composto inibidor no meio, e na maior concentração testada, *C. shehatae* e *P. stipitis* apresentaram apenas 4% e 8,6% da produção de etanol em relação ao controle, respectivamente, e 8% e 1,4% da biomassa relativa ao controle, respectivamente. Segundo os autores, incubações prolongadas promoveram uma aclimação das leveduras à presença de HMF. Os autores também observaram o consumo de HMF, apesar de ter ocorrido mais lentamente quando comparado com o outro composto furano testado (furfural).

Liu et al. (2004) avaliaram a resposta adaptativa de *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 à presença de HMF nas concentrações de $1,26 \text{ g.L}^{-1}$ a $15,13 \text{ g.L}^{-1}$. A maior concentração testada foi completamente inibitória ao crescimento da levedura, e os autores notaram que nas outras concentrações toleráveis o micro-organismo foi capaz de reestabelecer seu crescimento após uma longa fase *lag* inicial, a qual teve sua duração dependente da concentração do inibidor presente no meio, atingindo um período de 8 horas na presença de $3,78 \text{ g.L}^{-1}$. Os autores ainda detectaram a presença de furano-2,5-dimetanol como produto de degradação

obtido pela redução do HMF pelas leveduras. Eles também encontraram o produto da oxidação do aldeído inibidor, mas em quantidades não significativas.

Bellido et al. (2011) avaliaram a influência de HMF nas concentrações de 0,1 g.L⁻¹ e 0,5 g.L⁻¹ sobre o metabolismo de *Pichia stipitis*, em meio contendo 35 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de xilose. De acordo com os autores, o consumo de xilose foi afetado negativamente pela presença do inibidor na concentração de 0,5 g.L⁻¹. O consumo de glicose e a produção de biomassa não foram afetados pela presença do inibidor, revelando perfis semelhantes ao do controle.

2.4.3. Compostos fenólicos

As paredes celulares de plantas apresentam variados compostos fenólicos, os quais aparecem como componentes estruturais. Entre eles encontram-se a lignina e os ácidos fenólicos covalentemente ligados. No que se refere à função destas moléculas, as ligninas estão relacionadas ao suporte mecânico, além de atuarem como barreira para a difusão e invasão microbiana. Já os ácidos fenólicos ligados à parede celular estão relacionados, entre outras coisas, à regulação da extensão da parede celular e à defesa contra patógenos. Estes ácidos estão ligados covalentemente aos polissacarídeos da parede celular por meio de ligações éster em sítios altamente específicos, dimerizando-se e formando ligações cruzadas entre as moléculas de polissacarídeos (BORNEMAN et al., 1993).

Os compostos fenólicos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos derivados da fração de lignina são originados das subunidades G (guaiacil), como vanilina, ácido vanílico, acetovanilona, álcool vanilil entre outros, das subunidades S (siringil), como siringaldeído, ácido sirínico e outros, ou ainda das subunidades H (*p*-hidroxifenil), como por exemplo *p*-hidroxibenzaldeído e ácido *p*-hidroxibenzóico (MARTIN et al., 2007). Além destes, há também aqueles compostos fenólicos de baixa massa molar derivados dos ácidos fenólicos estruturais, que são principalmente os ácidos *p*-cumárico e ferúlico. Estes ácidos, comuns em paredes celulares de algumas angiospermas, principalmente das monocotiledôneas da família Gramineae, aparecem predominantemente na forma *trans* (MATHEW; ABRAHAM, 2004; BORNEMAN et al., 1993).

De acordo com Fenske, Griffin e Penner (1998), hidrolisados provenientes de matérias-primas herbáceas, como gramíneas e palha de milho, contêm menor teor de monômeros fenólicos que hidrolisados de madeiras e, desta forma, são menos tóxicos e mais facilmente fermentados. Ainda segundo os mesmos autores, apesar do baixo teor de fenólicos, estes hidrolisados podem apresentar grandes quantidades de acetato.

Os efeitos dos compostos fenólicos sobre os diversos tipos de micro-organismos são relativamente semelhantes, devido ao caráter hidrofóbico. O acúmulo de moléculas hidrofóbicas na membrana citoplasmática promove um aumento na fluidez e, conseqüentemente, facilita a entrada de prótons para o citoplasma, pois altera a seletividade da membrana. O ação de compostos hidrofóbicos com substituintes hidrofílicos na membrana celular é significativa pois, por apresentarem estrutura anfipática, são semelhantes aos fosfolipídios de membrana e apresentam alto efeito tóxico quando comparados a outros compostos orgânicos (PALMQVIST et al., 1999; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

A toxidez destes compostos tem sido relacionada diretamente à sua hidrofobicidade, por meio do cálculo do coeficiente de partição em octanol/água ($\log P_{o/w}$). Quanto mais hidrofóbico o composto, maior deve ser seu efeito tóxico para os micro-organismos (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGRAM, 1999). Além disso, quanto menor a massa molar do composto, mais expressivo deve ser o seu efeito tóxico sobre os micro-organismos (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

A Figura 2.17 representa esquematicamente os principais alvos dos compostos fenólicos nas células de micro-organismos que causam efeitos inibitórios no metabolismo dos mesmos.

Figura 2.17 - Principais alvos dos compostos fenólicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos de biomassas vegetais nas células de micro-organismos (Adaptado de MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

2.4.3.1. **Vanilina**

A vanilina, ou 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (Figura 2.18), é um aldeído fenólico de massa molar igual a $152,14 \text{ g.mol}^{-1}$, cuja solubilidade em água é relativamente baixa, de apenas 10 g.L^{-1} , à 25°C (MERCK, 1983). A vanilina isolada tem a aparência de um pó cristalino branco com odor doce de baunilha. Este composto é amplamente utilizado como flavorizante em alimentos, confeitaria, bebidas e perfumaria.

Figura 2.18 – Vanilina, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (MERCK, 1983).

Tran e Chambers (1986), ao avaliarem o efeito de diferentes compostos derivados de lignina sobre a fermentação alcoólica por *Pichia stipitis*, observaram

que a vanilina, mesmo nas baixas concentrações encontradas em hidrolisado hemicelulósico de carvalho vermelho, afetou negativamente a conversão de xilose em etanol. A presença de $0,091 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina no meio de cultura promoveu uma queda de 54,3% na produção de etanol em relação ao controle sem inibidor.

Ao avaliarem a produção de etanol por *Pichia stipitis* e *Candida shehatae*, em meio contendo 20 g.L^{-1} de xilose na presença de vanilina ($0,5 - 2,0 \text{ g.L}^{-1}$), Delgenes, Moletta e Navarro (1996) observaram que tanto o crescimento quanto a produção de etanol foram negativamente afetados pelo composto em todos os níveis testados, sendo a fermentação completamente inibida quando o meio continha $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ deste composto.

Ando et al. (1986), ao estudarem a influência da vanilina sobre a fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, demonstraram que a presença deste inibidor na concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ afetou negativamente as primeiras horas de fermentação mas, após 25 horas, a produção de etanol atingiu valores semelhantes ao do controle sem vanilina.

Para a levedura *Kluyveromyces marxianus*, Oliva et al. (2003), ao estudarem o efeito dos produtos de degradação dos materiais lignocelulósicos sobre a fermentação alcoólica a partir de glicose, observaram que a assimilação de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina pela levedura ocorreu em um período de 8 horas, enquanto a concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ foi assimilada somente após 16 horas. A vanilina foi completamente reduzida a álcool vanilil durante o cultivo e, segundo os autores, esta conversão do composto a um produto menos tóxico foi essencial para que a produção de etanol ocorresse. Foi atingida uma concentração de etanol de 12 g.L^{-1} a partir de 30 g.L^{-1} de glicose após um período de 30 horas.

Fitzgerald et al. (2004), ao estudarem o efeito antimicrobiano de vanilina sobre culturas das bactérias *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* e *Listeria innocua* concluíram que a ação inibitória da vanilina apresentou um perfil bacteriostático ao invés de bactericida devido ao aparecimento de colônias nas placas inoculadas com culturas expostas a concentrações mínimas inibitórias do composto. Os mesmos autores demonstraram, por meio da técnica de citometria de fluxo, que a vanilina provocou danos à membrana plasmática dos micro-organismos estudados. Em *E. coli*, quando as culturas foram expostas a $7,6 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina, observou-se um aumento de 29% de células com danos à membrana em 60 minutos de exposição, e esta taxa diminuiu para 13% com o aumento do

tempo de incubação, indicando recuperação das células. As culturas de *L. plantarum* expostas a $10,6 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina apresentaram 10% de células com danos à membrana em 60 minutos e esta taxa cresceu para 55% com o aumento do tempo de exposição. *L. innocua* apresentaram apenas uma pequena quantidade de células com danos à membrana em 60 minutos, 4%, e esta taxa não cresceu mesmo com aumento no tempo de incubação. Desta forma, os autores concluíram que o efeito inibitório da vanilina é dependente do tempo de exposição à vanilina, da concentração do composto e do micro-organismo utilizado.

Em estudos sobre a destoxificação oxidativa de inibidores derivados da madeira por *Gluconobacter oxydans*, Buchert e Niemela (1991) constataram que a presença de vanilina no meio inibe o consumo da xilose pela bactéria nas primeiras horas de cultivo e, aparentemente, após este período a bactéria é capaz de reestabelecer o consumo do açúcar. Os autores também observaram que a bactéria foi capaz de remover do meio quase completamente a vanilina nas concentrações de $0,5$ a $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ em um período de 3 dias mas, na concentração de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$, este composto permaneceu no meio de cultivo mesmo por períodos mais prolongados. Além disso, a taxa de consumo de xilose foi dependente do decréscimo da concentração de vanilina no meio. Os produtos de degradação encontrados foram o ácido vanílico e o álcool vanilil, sendo que o produto oxidado foi encontrado em proporções muito maiores que o reduzido.

2.4.3.2. **Siringaldeído**

O siringaldeído, ou 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído (Figura 1.19), é um aldeído fenólico de massa molar igual a $182,17 \text{ g.mol}^{-1}$, com baixa solubilidade em água (MERCK, 1983).

Figura 2.19 – Siringaldeído, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído (MERCK, 1983).

Tran e Chambers (1986), ao avaliarem o efeito do siringaldeído sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis*, observaram que a produção de etanol foi reduzida em 72,2%, ou seja, sua concentração decresceu de 22,3 g.L⁻¹ para 6,2 g.L⁻¹ quando o meio continha 0,22 g.L⁻¹ do inibidor. Os autores ainda, com base nos resultados, atribuíram ao grupo metoxil adicional presente no siringaldeído uma redução na toxicidade deste composto em relação à produção de etanol quando comparado a outros inibidores fenólicos.

Um comportamento similar sobre a toxidez relativa de siringaldeído em relação a outros inibidores fenólicos devido à presença ou ausência do grupo metoxil também foi encontrado por Delgenes, Moletta e Navarro (1996). Os autores investigaram o efeito do siringaldeído em concentrações entre 0,2 g.L⁻¹ e 1,5 g.L⁻¹ e constataram que tanto o crescimento quanto a produção de etanol a partir de xilose por *Pichia stipitis* e *Candida shehatae* foram afetados negativamente na presença do composto. O grau de inibição foi dependente da concentração de siringaldeído no meio, sendo que na concentração de 1,5 g.L⁻¹ a produção de etanol por *Pichia stipitis* atingiu apenas 6% daquela obtida no controle sem inibidor.

De acordo com Ando et al. (1986), o siringaldeído, em concentrações de até 1,0 g.L⁻¹, não apresenta efeitos negativos sobre a fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo os autores, ocorreu aumento de 4 horas na fase lag na presença de siringaldeído. Um comportamento semelhante foi observado por Buchert e Niemela (1991), pois a presença de siringaldeído a 2,0 g.L⁻¹ no meio não afetou o consumo de xilose por *Gluconobacter oxidans* em relação ao controle. Ao final de 5 dias de fermentação, 85% do siringaldeído

inicial ainda permaneceu no meio, e o álcool siringil foi o principal produto de degradação, encontrado em baixas concentrações (20 mg.L^{-1}).

2.4.3.3. **Ácido ferúlico**

O ácido ferúlico, cujo nome sistemático é ácido (2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propen-2-oico, está representado na Figura 2.20. Ele é encontrado covalentemente ligado a polissacarídeos por ligações éster e a componentes da lignina por ligações éter ou éster. Este composto apresenta diversas aplicações como ação anti-inflamatória, antibacteriana, apresenta benefícios para o sistema cardiovascular, além de possuir atividade antioxidante, que é empregado em cosméticos para proteção da pele (MATHEW; ABRAHAM, 2004).

Figura 2.20 – Ácido ferúlico, ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenóico, ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (MERCK, 1983).

O impacto do ácido ferúlico sobre a fermentabilidade de *Pichia stipitis* não tem sido amplamente relatado na literatura. No entanto, vários outros autores tem estudado o efeito deste ácido em processos fermentativos empregando outras leveduras.

Em estudos com *Candida guilliermondii*, Pereira, Mussatto e Roberto (2011) verificaram que o crescimento celular desta levedura foi afetado negativamente pela presença de ácido ferúlico no meio de fermentação em todas as concentrações testadas ($0,2$ a $0,6 \text{ g.L}^{-1}$). No maior nível avaliado, a redução no crescimento celular foi de 30% em relação ao controle. Neste trabalho, não foi observado qualquer efeito do ácido ferúlico sobre o consumo de xilose nas concentrações testadas, entretanto a presença de $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ deste composto no meio de fermentação afetou negativamente a produção de xilitol em 15%. Os parâmetros fermentativos de conversão de substrato em células e etanol e de

produtividade foram todos reduzidos na presença do inibidor quando comparados com o controle.

Larsson et al. (2000), ao avaliarem a influência do ácido ferúlico em concentrações de 0,02 a 1,0 g.L⁻¹ sobre a fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, observaram que a concentração de 0,02 g.L⁻¹ não afetou a produtividade volumétrica, os fatores de conversão de substrato em etanol e células e a velocidade específica de crescimento. Por outro lado, o aumento desta concentração para 0,2 g.L⁻¹ gerou uma queda nos parâmetros fermentativos avaliados, com exceção do fator de conversão de substrato em produto, que não foi afetado pela presença deste inibidor em nenhuma concentração testada. Tomando-se o controle como referência, o fator de conversão de substrato em células correspondeu a 83%, a velocidade específica de crescimento foi de 64% e a produtividade em etanol correspondeu a 46%. Já na concentração de 1,0 g.L⁻¹ de ácido ferúlico, houve uma queda de aproximadamente 80% na produtividade volumétrica em etanol em relação ao controle.

2.4.3.4. **Ácido *p*-cumárico**

O ácido *p*-cumárico (Figura 2.21) é encontrado esterificado a arabinosilanas no início do desenvolvimento da parede celular primária, assim como o ácido ferúlico e, no desenvolvimento tardio, este ácido é extensivamente esterificado à lignina na parede celular de monocotiledôneas do tipo gramíneas (XU et al., 2005).

Figura 2.21 - Ácido *p*-cumárico, ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenóico, ácido *p*-hidroxicinâmico MM=164,15 g.mol⁻¹ (MERCK, 1983).

Assim como para o ácido ferúlico, o impacto do ácido *p*-cumárico sobre a fermentabilidade de *Pichia stipitis* também não tem sido amplamente descrito na literatura. No entanto, existem relatos sobre o metabolismo do ácido *p*-cumárico em sucos de uva e vinhos por leveduras, e o comportamento metabólico das mesmas na presença deste composto, tendo em vista que produtos de degradação deste ácido podem alterar características organolépticas importantes do vinho, como descrito a seguir.

Segundo Salameh et al. (2008), compostos fenólicos voláteis são produzidos por diversos micro-organismos como consequência do metabolismo de ácidos hidroxicinâmicos, principalmente os ácidos *p*-cumárico e ferúlico, os quais estão esterificados na parede celular da uva e são liberados devido à atividade de estearases de leveduras. O ácido *p*-cumárico é convertido pela ação de duas enzimas. Primeiramente, uma hidroxicinamato descarboxilase converte o ácido hidroxicinâmico em um derivado vinilfenólico, o qual é então reduzido a derivados etilfenólicos por uma vinilfenol redutase. Leveduras pertencentes aos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* são consideradas micro-organismos deteriorantes de alimentos e bebidas por terem a capacidade de realizar esta conversão e, assim, alterar as características organolépticas do vinho, prejudicando sua qualidade.

Larsson et al. (2000) avaliaram o efeito do ácido *p*-cumárico sobre o metabolismo fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* em concentrações variando de 20 a 1000 mg.L⁻¹ e relataram que este composto causou queda de 37% na produtividade em etanol no maior nível avaliado, e que praticamente não houve impacto negativo sobre os fatores de conversão de substrato a etanol ou células.

2.4.4. Efeito interativo dos compostos inibidores

A partir de estudos realizados com álcoois, aldeídos e ácidos aromáticos sobre o metabolismo fermentativo de micro-organismos, Zaldivar, Martinez e Ingram (2000) demonstraram que a combinação dos diversos compostos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos é o que resulta na sua grande toxicidade, sendo este efeito de interação mais significativo que a presença de um único composto tóxico.

Diaz et al. (2009) observaram que o ácido acético na concentração de 3 g.L⁻¹, quando em combinações binárias com furfural ou ácido fórmico, produziu inibição total do crescimento de *Pichia stipitis*. Os autores atribuíram este evento ao efeito sinérgico de inibição entre os compostos, pois o crescimento celular havia sido detectado na presença do ácido acético individualmente mesmo na concentração de 6 g.L⁻¹, que foi a maior testada.

Estudos realizados por Bellido et al. (2011) sobre o comportamento de *Pichia stipitis* na presença de 1,5 g.L⁻¹ de ácido acético, 0,15 g.L⁻¹ de furfural e 0,05 g.L⁻¹ de HMF mostraram que o consumo de açúcares foi afetado negativamente, pois a xilose não foi utilizada pelo micro-organismo e o consumo da glicose se deu a uma taxa menor quando comparada ao controle.

O efeito sinérgico de aldeídos aromáticos presentes em hidrolisados sobre o crescimento e fermentação alcoólica por *Escherichia coli* foi avaliado por Zaldivar, Martinez e Ingram (1999), em combinações binárias. Os autores testaram estes compostos nas concentrações necessárias para inibir 25% do crescimento do micro-organismo (IC₂₅). Foi constatado que o furfural em combinações binárias com 5-hidroximetilfurfural, 4-hidroxibenzaldeído, siringaldeído ou vanilina apresentou efeito sinérgico na inibição do crescimento da levedura, pois houve uma diminuição superior a 75% no crescimento do micro-organismo quando comparado com o controle sem inibidores. Isso demonstra que as combinações destes compostos apresentam um impacto mais que aditivo, pois suas ações conjuntas são mais prejudiciais que a soma do efeito individual.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo identificar e caracterizar o efeito de compostos ácidos, fenólicos e furanos liberados durante a hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos, especificamente a palha de arroz e o bagaço de malte, sobre a fermentação de misturas de glicose e xilose a etanol por *Pichia stipitis*.

3.2. Objetivos específicos

- Identificação e quantificação dos compostos inibitórios presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e de bagaço de malte;
- Avaliação do efeito individual dos compostos inibidores identificados nos hidrolisados sobre o crescimento, consumo de açúcares, produção de etanol por *Pichia stipitis*, assim como monitoramento da assimilação destes compostos pela levedura;
- Avaliação do perfil cinético da fermentação por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e de bagaço de malte;
- Avaliação do perfil cinético da fermentação por *Pichia stipitis* em meios sintéticos com composições químicas semelhantes aos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de bagaço de malte.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fermentação I do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, da Universidade de São Paulo.

4.1. Adaptação de metodologias analíticas

4.1.1. Curvas de calibração para determinação da concentração celular

4.1.1.1. Curva de calibração em meio semissintético

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, fornecida pela USDA de Peoria, Illinois. Recentemente, Kurtzman e Suzuki (2010) propuseram a mudança do gênero desta levedura para *Scheffersomyces* por meio de análises filogenéticas. No entanto, no presente trabalho foi adotada a denominação antiga.

A cultura foi mantida em meio de repique em ágar YMDP (3,0 g de extrato de levedura, 3,0 g de extrato de malte, 5,0 g de peptona, 10 g de glicose, 20 g de ágar para 1 L de água destilada). Foram feitas transferências periódicas da cultura e conservação em geladeira a 4°C.

Com o auxílio de uma alça de platina, células de *Pichia stipitis* recém-repicadas em meio YMDP foram transferidas para um tubo de ensaio com 5mL de água esterilizada. Em seguida, uma alíquota de 1 mL desta suspensão celular foi transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio de cultura, conforme composição mostrada na Tabela 4.1. As células foram incubadas em shaker sob a agitação de 200 rpm a 30°C por um período de 24 horas.

Decorrido o período de 24 horas, um volume de 100 mL do cultivo foi centrifugado a 2000 rpm por 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com água destilada. Para obtenção de uma suspensão densa, as células recuperadas foram ressuspensas em 50 mL de água destilada. A partir desta suspensão, foram preparadas diluições de 10, 25, 50, 100, 200, 250, 500 e 1000 vezes para determinação das absorbâncias em

espectrofotômetro (Hitachi U1800 High Technologies Corporation, Tokyo, Japan) a 600nm.

Tabela 4.1 - Composição do meio de cultura.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Xilose	30
Extrato de levedura	3
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3
KH ₂ PO ₄	19

Para determinação da massa celular, 3mL da suspensão celular concentrada foram transferidos para cadinhos de porcelana previamente tarados. Os cadinhos foram colocados em estufa a 100°C por 24 horas e após resfriamento do material em dessecador por 1 hora, o cadinho foi pesado para determinação da massa seca de células. Os cadinhos foram novamente colocados em estufa a 100°C, porém por um tempo de 1 hora. O procedimento foi repetido até obtenção da massa constante. Os resultados de absorbância das diversas amostras diluídas foram então relacionados aos valores de massa correspondentes para a construção da curva de calibração.

4.1.1.2. ***Curva de calibração em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz***

O mesmo procedimento descrito no item 4.1.1.1 foi utilizado para construção da curva de calibração para determinação da concentração celular em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, com exceção do meio de cultivo utilizado, o qual consistiu de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtido conforme descrição fornecida no item 4.3. Para utilização do hidrolisado previamente obtido por hidrólise com ácido diluído como meio de fermentação, foi feito inicialmente o ajuste do pH para 5,5 com solução esterilizada de NaOH 10 N. Após esta etapa, o hidrolisado foi centrifugado a 2000xg por 20 minutos, para remoção de sólidos. A seguir, o hidrolisado foi suplementado com 3 g.L⁻¹ de

extrato de levedura e devidamente diluído com água destilada esterilizada de forma a se obter uma concentração inicial de xilose de aproximadamente 30 g.L⁻¹.

4.1.1.3. ***Curva de calibração em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte***

Para obtenção curva de calibração para determinação da concentração celular em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, foi realizado um procedimento semelhante àquele descrito no item 4.1.1.3, exceto pelo fato de ter sido acrescentada uma etapa adicional de lavagem das células com água destilada em pH 12 para remoção de resíduos sólidos das células, os quais não foram removidos com a etapa de lavagem com água destilada.

4.1.2. **Cromatografia líquida de alta eficiência para análise de furanos e compostos fenólicos**

4.1.2.1. ***Padrões cromatográficos***

Os padrões utilizados, bem como os respectivos graus de pureza e fabricantes encontram-se listados na Tabela 4.2.

4.1.2.2. ***Reagentes***

Para a composição da fase móvel, foi utilizada água deionizada, acetonitrila (Tedia Company) e ácido acético glacial (F. Maia Indústria e Comércio Ltda) na proporção de 88:11:1. A fase móvel foi filtrada em membrana Durapore (Millipore), PVDF, hidrofílica, 0.45 µm, 47 mm e desgaseificada em banho de ultrassom por 20 minutos.

4.1.2.3. ***Instrumentos analíticos***

Todas as análises, incluindo amostras e padrões, foram efetuadas em sistema cromatográfico de alta eficiência Agilent Technologies 1260 Infinity, gerenciado pelo software de aquisição de dados OpenLab EZChrom, Agilent

Technologies. Os componentes das amostras foram separados pela coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 4,6 x 100 mm (diâmetro interno x comprimento) empacotada com partículas de 3,5 μm (Agilent Technologies) e, posteriormente, pela coluna Waters Spherisorb ODS2 4,6 x 100 mm (diâmetro interno x comprimento) empacotada com partículas de 5,0 μm (Waters). A separação se deu a um fluxo de eluente de 0,8 mL/min, a 25°C, utilizando-se um volume de amostra de 20 μL . O detector por absorvância no ultravioleta foi empregado no comprimento de onda de 276 nm.

Tabela 4.2 - Compostos utilizados para construção das curvas de calibração com respectivos graus de pureza e fabricantes.

Composto	Grau de pureza	Fabricante
5-hidroximetilfurfural	0,99	Sigma-Aldrich
Furfural	0,98	Dinâmica Química Contemporânea Ltda.
Álcool vanilil	0,98	Sigma-Aldrich
Ácido vanílico	$\geq 0,97$	Fluka Chemika
Ácido siríngico	$\geq 0,97$	Fluka Chemika
Ácido ferúlico	0,99	Sigma-Aldrich
Vanilina	NI	Nuclear
Siringaldeído	$\geq 0,97$	Fluka Chemika
Ácido <i>p</i> -cumárico	$\geq 0,98$	Sigma-Aldrich

NI= Não informado.

4.1.2.4. **Método de quantificação**

Para a quantificação dos analitos, foi utilizado o método do padrão externo, com as curvas de calibração construídas a partir da diluição de uma solução aquosa estoque. Para a completa solubilização dos compostos na solução, foi utilizado banho de ultrassom (Unique Lavadora Ultra-Sônica) por 20 minutos. Os valores de concentração de cada composto na solução estoque, corrigidos em função da pureza, estão listados na Tabela 4.3 (coluna Agilent ZORBAX Eclipse

Plus C18) e na Tabela 4.4 (coluna Waters Spherisorb ODS2). A solução padrão foi diluída 2, 5, 10, 25, 50 e 100 vezes, filtrada em membranas de 0,45 µm e a injeção foi realizada em duplicata.

Tabela 4.3 - Concentrações dos compostos na solução estoque para construção de curva de calibração na coluna ZORBAX Eclipse Plus C18.

Composto	Concentração (mg/L)
5-hidroxi metilfurfural	144
Furfural	123
Álcool vanilil	123
Ácido vanílico	104
Ácido sirínico	97,9
Ácido ferúlico	96
Vanilina	113
Siringaldeído	101

Tabela 4.4 - Concentrações dos compostos na solução estoque para construção de curva de calibração na coluna Waters Spherisorb C18.

Composto	Concentração (mg/L)
Ácido gálico	122,5
5-hidroxi metilfurfural	173,0
Ácido furóico	109,5
Álcool vanilil	116,5
Furfural	153,0
Pirocatecol	98,5
Ácido vanílico	123,5
Ácido sirínico	97,0
Vanilina	131,5
Siringaldeído	95,5
Ácido <i>p</i>-cumárico	114,0
Ácido ferúlico	102,5

4.2. Obtenção e caracterização da matéria prima

4.2.1. Matéria prima

A palha de arroz *in natura*, fornecida por produtores de arroz da região de Lorena/SP, foi exposta ao sol para secagem, moída a 2 x 0,5 cm em moinho de martelo (BEMEDETTI – dupla 270), pesada, ensacada, caracterizada e armazenada até a realização do processo de hidrólise com ácido diluído. O teor de umidade da palha foi determinado para auxiliar nos cálculos de dosagem de ácido necessário ao processo de hidrólise.

4.2.2. Caracterização da palha de arroz

A caracterização da palha de arroz foi realizada para a determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, com base na metodologia descrita por Browning (1967). Aproximadamente 2,0 g de palha de arroz seca foram transferidos para um béquer de 50 mL contendo 10 mL de ácido sulfúrico (72% p/p). A mistura foi mantida em banho termostatizado, a 60°C durante 7 minutos, sob agitação constante com bastão de vidro. Decorrido este período, a reação foi interrompida pela adição de 275 mL de água destilada e foi feita a transferência quantitativa do conteúdo do béquer para um Erlenmeyer de 500 mL. A seguir, o frasco foi fechado com papel alumínio e levado à autoclave à 1 atm, 121°C durante 45 minutos, para promover a completa hidrólise dos oligômeros restantes.

Posteriormente à reação de hidrólise, o frasco foi resfriado à temperatura ambiente para a separação das frações sólida e líquida por meio de filtração em papel de filtro quantitativo previamente tarado. O hidrolisado foi recolhido em balão volumétrico de 500 mL, juntamente com toda a água destilada utilizada para lavagem do sólido retido no papel de filtro. A fração líquida obtida foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência e as concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético foram utilizadas para determinar as porcentagens de celulose, hemicelulose e grupos acetil que compõem a palha de arroz. O teor de celulose foi calculado por meio da equação 4.1, o de hemicelulose, por meio da equação 4.2 e o de ácido acético, pela equação 4.3.

$$\%Celulose = \frac{M_G}{M_{PA}} \times F_C \times F_{PH} \times 100 \quad (4.1)$$

$$\%Hemicelulose = \frac{(M_X + M_A)}{M_{PA}} \times F_C \times F_{PH} \times 100 \quad (4.2)$$

$$\%Grupos\ Acetil = \frac{M_{HAc}}{M_{PA}} \times F_C \times 100 \quad (4.3)$$

Onde:

M_{PA} = Massa seca da palha de arroz

M_G = Concentração de glicose (g.L^{-1}) x 0,5 L

M_X = Concentração de xilose (g.L^{-1}) x 0,5 L

M_A = Concentração de arabinose (g.L^{-1}) x 0,5 L

M_{HAc} = Concentração de ácido acético (g.L^{-1}) x 0,5 L

F_{PH} = Fator de perda de hidrólise: 1,055 para celulose e 1,155 para hemicelulose

F_C = Fator de conversão: 0,90 para celulose, 0,88 para hemicelulose e 0,72 para grupos acetil

O resíduo sólido retido no papel de filtro, o qual corresponde à lignina insolúvel, foi lavado novamente com 1,5 L de água destilada e posteriormente seco em estufa a 105°C até atingir massa constante. A seguir, este resíduo foi submetido a um tratamento térmico em mufla a 800°C por 2 horas até obtenção de peso constante, para determinação do teor de cinzas. Para o cálculo dos teores de lignina insolúvel e cinzas presentes na palha de arroz, foram utilizadas as equações 4.4 e 4.5, respectivamente.

$$\%Lignina\ insolúvel = \frac{M_{RS}}{M_{PA}} \times 100 \quad (4.4)$$

$$\%Cinzas = \frac{M_{CINZAS}}{M_{PA}} \times 100 \quad (4.5)$$

Onde:

M_{RS} = Massa seca do resíduo sólido – Massa de cinzas

M_{PA} = Massa seca da palha de arroz

M_{CINZAS} = Massa de cinzas após calcinação

Para determinação da lignina solúvel em meio ácido, foi empregada a metodologia descrita por Rocha, 2000. Uma alíquota de 5 mL de hidrolisado foi alcalinizada até pH 12 pela adição de NaOH 6 M e diluída em 100 mL de água destilada. Foi determinada a absorbância desta solução em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 280 nm, sendo água em pH 12 a referência (A_{Lig280}). A concentração de lignina solúvel foi calculada com base nas equações 4.6 e 4.7, levando-se em consideração a normalização das concentrações de furfural e 5-HMF em função do fator de diluição empregado. A porcentagem de lignina solúvel foi calculada por meio da equação 4.8.

$$A_{PD280} = (C_F \times \varepsilon_F + C_{HMF} \times \varepsilon_{HMF}) \quad (4.6)$$

$$C_{LS} = [4,187 \times 10^{-2}(A_{Lig280} - A_{PD280}) - 3,279 \times 10^{-4}] \quad (4.7)$$

$$\%Lignina\ solúvel = \frac{C_{LS} \times 0,5}{M_{PA}} \times 100 \quad (4.8)$$

Onde:

M_{PA} = Massa seca de palha de arroz

C_{LS} = Concentração de lignina solúvel em meio básico ($g.L^{-1}$)

A_{Lig280} = Absorbância da solução em 280 nm x taxa de diluição

C_F = Concentração de furfural ($g.L^{-1}$)

C_{HMF} = Concentração de 5-hidroximetilfurfural

ε_F = Coeficiente de extinção do furfural ($146,85\ L.g^{-1}.cm^{-1}$)

ε_{HMF} = Coeficiente de extinção do 5-hidroximetilfurfural ($114,00\ L.g^{-1}.cm^{-1}$)

4.3. Obtenção e caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e bagaço de malte.

Os hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e bagaço de malte foram obtidos por catálise ácida conforme condições descritas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Condições empregadas para obtenção dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e bagaço de malte.

Condição	Hidrolisado de palha de arroz	Hidrolisado de bagaço de malte
Capacidade do reator de aço inoxidável utilizado	350 L	50 L
Quantidade de H ₂ SO ₄ 98% (p/p) empregada	100 mg por grama de matéria seca	100 mg por grama de matéria seca
Relação matéria seca: solução ácida	1:10 (g/mL)	1:8 (g/g)
Temperatura e tempo de reação	126 °C por 30 minutos	120 °C por 17 minutos
Separação das frações líquida (hidrolisado hemicelulósico) e sólida (celulignina)	Filtração	Filtração
Concentração a vácuo do hidrolisado	Concentração a 70 °C ± 5 em reator de 5 L	Concentração a 70 °C ± 5 em reator de 30 L
Hidrolisado obtido por	Castro, 2012	Garcia, 2012
Referência adotada pelos autores	Roberto, Mussatto e Rodrigues, 2003	Mussatto e Roberto, 2005

Os hidrolisados obtidos foram armazenados a 4 °C até sua utilização.

Para caracterização química dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e bagaço de malte obtidos por hidrólise ácida, foram realizadas análises por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram avaliados os teores de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural e fenólicos de baixa massa molar provenientes da degradação da lignina e hemicelulose.

4.4. Ensaios fermentativos

Os ensaios fermentativos foram divididos em duas etapas distintas. Na primeira, foi feita uma avaliação do impacto do furfural, 5- hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido ferúlico, vanilina, siringaldeído e ácido p-cumárico individualmente sobre o metabolismo fermentativo da levedura *Pichia stipitis*.

Nesta etapa, foram avaliadas faixas de concentrações destes compostos baseadas naquelas presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e de bagaço de malte. Na segunda etapa, foram analisados os perfis fermentativos da levedura nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de bagaço de malte, bem como em meios sintéticos com composição semelhante àquela dos hidrolisados.

4.4.1. Preparo do inóculo

4.4.1.1. *Meio semissintético*

Alçadas de *Pichia stipitis* recém-repicada em meio (YMPD) foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Após a homogeneização da suspensão, alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio descrito na Tabela 4.6. Para o preparo do meio foram utilizadas soluções concentradas de cada componente, as quais foram preparadas separadamente e esterilizadas a 121°C por 20 minutos, com exceção da solução de xilose, a qual foi autoclavada a 112°C por 15 minutos. As soluções foram misturadas assepticamente para obtenção de um meio de cultura com a concentração desejada de cada nutriente.

Os frascos inoculados foram incubados em agitador rotatório a 30°C, 200 rpm por um período de 24 horas. Decorrido este tempo, as células foram separadas por centrifugação a 1100xg por 25 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em água destilada esterilizada a fim de fazer uma lavagem das mesmas. A suspensão foi novamente centrifugada nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em água destilada esterilizada de forma a se obter uma suspensão celular densa. Com base na concentração celular desta suspensão, foi calculado o volume necessário para fornecer uma concentração celular inicial de 1,0 g.L⁻¹ no meio de fermentação.

Tabela 4.6 - Meio de cultura utilizado para preparo do inóculo.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Xilose	30
Extrato de levedura	3
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3
KH ₂ PO ₄	19

4.4.1.2. *Hidrolisados hemicelulósicos*

O procedimento empregado para o preparo do inóculo seguiu a descrição do item 4.4.1.1, com exceção do meio de cultura utilizado, o qual foi hidrolisado de palha de arroz ou bagaço de malte obtido conforme o item 4.3. Para utilização dos hidrolisados como meio para o inóculo, o pH foi ajustado em 5,5 com solução esterilizada de NaOH 10 N. Após esta etapa, o hidrolisado foi centrifugado a 2000xg por 20 minutos, para remoção de sólidos. A seguir, o hidrolisado foi suplementado com 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura e devidamente diluído com água destilada esterilizada de forma a se obter uma concentração inicial de xilose de aproximadamente 30 g.L⁻¹.

4.4.2. Meio e condições de fermentação

4.4.2.1. *Efeito individual dos inibidores*

Para avaliação do impacto individual dos inibidores sobre o comportamento fermentativo da levedura *Pichia stipitis*, os cultivos foram realizados em meio semissintético conforme composição descrita na Tabela 4.7. As soluções de cada componente foram preparadas separadamente e esterilizadas a 121°C por 20 minutos, com exceção das soluções de xilose e glicose, as quais foram esterilizadas a 112°C por 15 minutos.

Tabela 4.7 - Composição do meio de fermentação.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Xilose	50
Glicose	8
Extrato de levedura	3
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3
KH ₂ PO ₄	19

Os compostos com potencial inibitório foram adicionados ao meio individualmente, em 5 diferentes concentrações, situadas em faixas listadas na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Faixa de concentração dos compostos inibidores (furanos, ácidos fracos e fenólicos de baixa massa molar) empregados para avaliação individual do perfil fermentativo de *Pichia stipitis*.

Composto	Concentrações (g.L ⁻¹)	
	Menor nível	Maior nível
5-HMF	0,218	0,553
Furfural	0,012	0,084
Ácido acético	1,5	4,5
Ácido ferúlico	0,105	0,802
Vanilina	0,055	0,175
Siringaldeído	0,090	0,620
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,045	0,423

A adição dos compostos ao meio de fermentação, bem como a forma de esterilização foi realizada de maneiras diferentes de acordo com cada composto. O ácido ferúlico, a vanilina e o siringaldeído foram pesados em papel alumínio esterilizado e adicionados ao meio de cultura imediatamente antes da inoculação. Para o 5-HMF, foi preparada uma solução mãe com a concentração de 1,5 g.L⁻¹ a

qual foi filtrada em membrana de 0,22 μm para esterilização e o volume necessário para atingir a concentração desejada foi adicionado ao meio de cultura imediatamente antes da inoculação. O furfural, um composto no estado líquido à temperatura ambiente, foi pesado em papel alumínio esterilizado e foi preparada uma solução mãe de 1 g.L^{-1} em água destilada esterilizada, imediatamente antes de seu uso. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz e calor, para evitar degradação do composto. Para o ácido acético, foi preparada uma solução mãe com concentração de 40 g.L^{-1} , a qual teve seu pH corrigido para 5,5 com solução de NaOH 10N e foi autoclavada à 1 atm durante 15 minutos. Esta solução foi armazenada a 4°C até sua utilização, e o volume necessário para atingir as concentrações desejadas foi adicionado ao meio de cultura imediatamente antes da inoculação. Para o ácido *p*-cumárico, foi preparada uma solução com a concentração de 1 g.L^{-1} , a qual teve seu pH corrigido para 5,5 com solução de NaOH, o que promoveu completa solubilização do composto. Esta solução foi filtrada em membrana de 0,22 μm para esterilização e o volume necessário para atingir as concentrações desejadas foi adicionado ao meio de cultura imediatamente antes da inoculação.

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio, incubados em agitador rotatório a 200 rpm, 30°C por um período de 30 horas. Durante o tempo de fermentação, foram retiradas amostras assepticamente em tempos de 0, 4, 8, 12, 20, 24 e 30 horas para o acompanhamento do crescimento celular, pH, consumo de glicose e xilose, produção de etanol e concentração dos compostos testados. Os ensaios foram realizados com repetição.

4.4.2.2. *Perfil fermentativo da levedura Pichia stipitis em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e de bagaço de malte*

Para utilização dos hidrolisados como meios de fermentação, foi feito inicialmente o ajuste do pH para 5,5 com solução esterilizada de NaOH 10 N. Após esta etapa, os hidrolisados foram centrifugados a 2000xg por 20 minutos, para remoção de sólidos. A seguir, foram suplementados com 3,0 g.L^{-1} de extrato de levedura e devidamente diluídos com água destilada esterilizada de forma a se obter uma concentração inicial de xilose de aproximadamente 50 g/L.

As fermentações foram conduzidas em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de hidrolisado. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C sob agitação de 200 rpm, por 60 horas. Durante o tempo de fermentação, foram retiradas amostras assepticamente em tempos de 0, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas para o acompanhamento do crescimento celular, pH, consumo de glicose e xilose, produção de etanol e concentração dos compostos inibidores testados. Os ensaios foram realizados com repetição.

Além disto, ainda foram preparados meios semissintéticos com composição semelhante àquela dos hidrolisados, tanto com relação aos açúcares quanto aos compostos com potencial inibitório. Os valores de referência utilizados foram aqueles obtidos na caracterização química dos hidrolisados realizada conforme descrito no item 4.3.

4.5. Acompanhamento analítico dos experimentos

4.5.1. Determinação do teor de umidade da palha de arroz

A determinação do teor de umidade da palha de arroz foi feita por meio da secagem da amostra em balança GEHAKA IV2000 com infravermelho a 100°C, até massa constante.

4.5.2. Concentração celular

O crescimento celular da levedura em meio semissintético foi acompanhado por medida da densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro (Hitachi U1800 High Technologies Corporation, Tokyo, Japan), empregando-se água como branco. Amostras de volume conhecido foram centrifugadas durante 25 minutos a 1100xg, recuperando-se a massa de células, que foi ressuspensa em água destilada e devidamente diluída para obtenção de valores de DO dentro da faixa da curva padrão. A concentração celular foi estimada pela equação que correlaciona concentração celular com a absorbância da amostra a 600nm.

Nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e bagaço de malte, o crescimento celular da levedura também foi acompanhado por medida da densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro (Hitachi U1800 High

Technologies Corporation, Tokyo, Japan), empregando-se água como branco. Amostras de volume conhecido foram centrifugadas durante 25 minutos a 1100xg, recuperando-se a massa de células, que foi ressuspendida em água destilada e submetida à centrifugação novamente. As células crescidas em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foram então ressuspendidas em água destilada e a amostra foi devidamente diluída para obtenção de valores de DO dentro da faixa da curva padrão. Por outro lado, as células crescidas em hidrolisado de bagaço de malte passaram por uma etapa adicional de lavagem com água destilada em pH 12, foram centrifugadas, ressuspendidas em água destilada e a amostra foi devidamente diluída para obtenção de valores de DO dentro da faixa da curva padrão. A concentração celular foi estimada pelas respectivas equações que correlacionam concentração celular com a absorbância da amostra a 600nm em cada hidrolisado.

4.5.3. Determinação do pH

O pH das amostras do meio de fermentação foram determinado por potenciometria, em equipamento HANNA HI221.

4.5.4. Varredura espectral em UV

A varredura espectral em UV das amostras retiradas do meio de fermentação foi realizada em espectrofotômetro, por meio da medida da absorbância na faixa de 190 a 600nm, utilizando-se água em pH 12 como branco, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. As amostras foram centrifugadas para remoção de células e o sobrenadante foi diluído com um fator de 100 vezes em água destilada com pH igual a 12.

4.5.5. Determinação da concentração de açúcares, etanol e ácido acético

As concentrações de glicose, xilose, etanol e ácido acético foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity ou Waters, nas seguintes condições: coluna Aminex HPX-87H 300 mm x 7.8 mm (BIO-RAD), temperatura de 45°C, eluente ácido

sulfúrico 0,01 N, filtrado e desgaseificado, fluxo de 0,6 mL/min, volume de amostra de 20 µL e o detector utilizado foi por índice de refração. Antes de serem submetidas à separação por cromatografia, as amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em filtros Sep-Pak Cartridge C18 (Waters Associate – Millipore). As concentrações dos compostos foram calculadas por meio do uso de equações obtidas por regressão linear a partir de curvas de calibração construídas com soluções padrão.

4.5.6. Determinação das concentrações de furanos e compostos fenólicos de baixa massa molar

As concentrações dos compostos fenólicos de baixa massa molar e furanos foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência em equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity, nas seguintes condições: coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6 x 100 mm 3,5 µm (Agilent Technologies) ou coluna Waters Spherisorb ODS2 4.6 x 100 mm 5,0 µm (Waters), temperatura de 25°C, eluente água: acetonitrila: ácido acético na proporção de 88:11:1, filtrado e desgaseificado, fluxo de 0,8 mL/min, volume de amostra de 20 µL e o detector utilizado foi por absorvância no ultravioleta a 276 nm. Antes de serem submetidas à separação por cromatografia, as amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em membranas com poros de 0,45 µm (Waters Associate – Millipore). As concentrações dos compostos foram calculadas por meio do uso de equações obtidas por regressão linear a partir de curvas de calibração construídas com soluções padrão.

4.6. Metodologia de análise dos resultados

4.6.1. Determinação dos parâmetros fermentativos

Para avaliar o processo fermentativo, foram calculados os seguintes parâmetros: fatores de conversão, produtividade e eficiência do processo.

O fator de conversão de substrato em células, $Y_{X/S}$ (g/g), foi calculado por regressão linear dos dados de concentração de células em função da concentração de açúcares (xilose + glicose). O $Y_{X/S}$ é a média dos coeficientes

angulares das retas obtidas pelo ajuste linear dos dados das repetições dos ensaios.

O fator de conversão de substrato em etanol, $Y_{P/S}$ (g/g), foi calculado por regressão linear dos dados de concentração de etanol em função da concentração de açúcares (xilose + glicose). O $Y_{P/S}$ corresponde à média dos coeficientes angulares das retas obtidas pelo ajuste linear dos dados obtidos nas repetições dos ensaios.

A produtividade volumétrica em etanol, Q_P (g.L⁻¹.h⁻¹), foi calculada por meio da equação 4.10:

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{(P_f - P_i)}{(t_f - t_i)} \quad (4.10)$$

Onde:

Q_P = produtividade volumétrica em etanol

P_i = concentração inicial de etanol

P_f = concentração final de etanol

t_i = tempo inicial da fermentação

t_f = tempo final da fermentação

A eficiência de conversão η (%), foi calculada por meio da equação 4.11:

$$\eta = \frac{Y_{P/S}(\text{calculado})}{Y_{P/S}(\text{teórico})} \times 100 \quad (4.11)$$

4.6.2. Determinação da porcentagem de decréscimo dos compostos fenólicos e dos açúcares

As porcentagens de redução dos compostos inibidores (%RCI) foram calculadas pela equação 4.12, e a porcentagem de consumo de açúcares (%CA) de acordo com a equação 4.13.

$$\%RCI = \left(\frac{I_{inicial} - I_{final}}{I_{inicial}} \right) \times 100 \quad (4.12)$$

$$\%CA = \left(\frac{A_{inicial} - A_{final}}{A_{inicial}} \right) \times 100 \quad (4.13)$$

Onde:

%RCI = porcentagem de redução na concentração dos compostos furanos, aldeídos fenólicos de baixa massa molar e ácidos fracos

$I_{inicial}$ = concentração inicial dos compostos furanos, aldeídos fenólicos de baixa massa molar e ácidos fracos no meio de fermentação

I_{final} = concentração final dos compostos furanos, aldeídos fenólicos de baixa massa molar e ácidos fracos no meio de fermentação

%CA = porcentagem de consumo de açúcares (xilose e glicose)

$A_{inicial}$ = concentração inicial de açúcares (xilose e glicose) no meio de fermentação

A_{final} = concentração final de açúcares (xilose e glicose) no meio de fermentação

4.6.3. Construção de gráficos e ajuste de dados

Os gráficos apresentados no presente trabalho bem como os ajustes lineares obtidos a partir de dados experimentais foram feitos por meio da utilização do programa OriginPro 8 (OriginLab Corporation).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção da curva de calibração DO X massa seca

A representação gráfica dos dados experimentais de absorbância das amostras de células em função do tempo, bem como a regressão linear destes dados, estão apresentadas nas Figuras 5.1 e 5.2. As equações então obtidas, as quais relacionam valores de absorbância das amostras com a massa seca de células, utilizadas para acompanhamento da formação de biomassa durante as fermentações, estão representadas pelas Equações 5.1, 5.2 e 5.3, que correspondem ao ajuste linear dos dados para meio semissintético, hidrolisado de palha de arroz e hidrolisado de bagaço de malte, respectivamente.

Figura 5.1- Curva de calibração de absorbância a 600 nm em função da concentração celular obtida por regressão linear dos dados experimentais, para meio semissintético. Na imagem, os dados experimentais são representados por (■) e a regressão linear dos dados por (—).

Figura 5.2 - Curvas de calibração de absorbância a 600 nm em função da concentração celular obtida por regressão linear dos dados experimentais, para hidrolisado de palha de arroz (A) e hidrolisado de bagaço de malte (B). Nas imagens, os dados experimentais são representados por (■) e a regressão linear dos dados por (—).

$$A = 3,2194x + 0,024 \quad r^2 = 0,994 \quad (\text{Equação 5.1})$$

$$A = 4,6846x + 0,0198 \quad r^2 = 0,998 \quad (\text{Equação 5.2})$$

$$A = 4,4958x + 0,017 \quad r^2 = 0,995 \quad (\text{Equação 5.3})$$

Onde:

A = absorbância da amostra a 600 nm

x = concentração celular em g.L^{-1}

5.2. Obtenção de curvas de calibração para análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência

Por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, foi possível separar todos os compostos de interesse presentes na amostra padrão utilizando a coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies), os quais foram eluídos em diferentes tempos de retenção, permitindo assim sua identificação em amostras desconhecidas. Na Figura 5.3 é mostrado o perfil cromatográfico da amostra padrão, na qual os compostos estão nas concentrações indicadas na Tabela 4.3.

Figura 5.3 - Perfil cromatográfico obtido pela análise de compostos furanos e fenólicos utilizando a coluna ZORBAX Eclipse Plus C18, conforme condições descritas no item 4.1.2.

As curvas de calibração obtidas pela regressão linear dos dados de concentração das soluções padrão em função das áreas fornecidas pelos picos nos cromatogramas apresentaram coeficientes de correlação da ordem de 0,999, com exceção do 5-hidroximetilfurfural, cujo coeficiente de correlação foi de 0,988, o que permitiu a utilização dos mesmos para determinação das concentrações dos compostos inibidores nas amostras em análise. As curvas obtidas bem como os respectivos coeficientes de correlação e os tempos de retenção de cada composto estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Curvas de calibração, coeficientes de correlação e tempos de retenção obtidos na análise de compostos furanos e fenólicos utilizando-se a coluna ZORBAX Eclipse Plus C18.

Composto	Curva de calibração	Coeficiente de correlação	Tempo de retenção (min)
5-hidroximetilfurfural	$C = 4,64946 \cdot 10^{-7} \times A$	0,987971	2,5
Álcool vanilil	$C = 2,73948 \cdot 10^{-6} \times A$	0,999550	3,5
Furfural	$C = 3,00869 \cdot 10^{-7} \times A$	0,999726	3,8
Ácido vanílico	$C = 1,52344 \cdot 10^{-6} \times A$	0,999710	6,4
Ácido sirínico	$C = 9,07239 \cdot 10^{-7} \times A$	0,999692	7,2
Vanilina	$C = 6,56770 \cdot 10^{-7} \times A$	0,999656	10,8
Siringaldeído	$C = 1,56181 \cdot 10^{-6} \times A$	0,999729	13,4
Ácido ferúlico	$C = 9,96856 \cdot 10^{-7} \times A$	0,999682	18,1

Foi verificado que a coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies) não foi capaz de separar os compostos siringaldeído e ácido *p*-cumárico, o que poderia prejudicar as análises, principalmente em hidrolisados, que são misturas complexas de compostos. Este fato pode ser observado na Figura 5.4, a qual corresponde aos cromatogramas destes compostos quando separados por esta coluna, e onde pode ser observada a coincidência nos tempos de retenção dos mesmos.

Figura 5.4 - Perfil cromatográfico obtido pela análise de: (A) ácido p- cumárico, (B) siringaldeído (C) ácido p-cumárico + siringaldeído, utilizando a coluna ZORBAX Eclipse Plus C18, conforme condições descritas no item 4.1.2.3.

Assim, além das curvas padrão apresentadas anteriormente, foram construídas também outras se utilizando a coluna Waters Spherisorb ODS2 (Waters) para separação dos analitos. Esta nova coluna foi capaz de separar não somente as substâncias analisados anteriormente, como também foram incluídos o ácido gálico, ácido furóico e pirocatecol, e foi possível separar o siringaldeído do ácido *p*-cumárico, os quais foram eluídos em tempos de retenção distintos. Entretanto, não houve prejuízo nas análises realizadas com a primeira metodologia adotada, pois foram feitas separações apenas em meios semissintéticos definidos que não continham siringaldeído e ácido *p*-cumárico simultaneamente. As análises de hidrolisado e de meios contendo misturas dos inibidores foram analisadas por meio da segunda metodologia desenvolvida. Na Figura 5.6 é mostrado o perfil cromatográfico da amostra padrão separada por meio desta nova coluna, na qual os compostos estão nas concentrações indicadas na Tabela 4.4.

Figura 5.5 - Perfil cromatográfico obtido pela análise de compostos furanos e fenólicos utilizando a coluna Waters Spherisorb ODS2, conforme condições descritas no item 4.1.2.

As curvas de calibração obtidas pela regressão linear dos dados de concentração das soluções padrão em função das áreas fornecidas pelos picos nos cromatogramas apresentaram coeficientes de correlação da ordem de 0,99 e 0,999, exceto pelo 5-hidroximetilfurfural, cujo coeficiente de correlação foi de 0,989, o que permitiu a utilização dos mesmos para determinação das concentrações dos analitos. Os dados estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Curvas de calibração, coeficientes de correlação e tempos de retenção obtidos na análise de compostos furanos e fenólicos utilizando-se a coluna Waters Spherisorb ODS2.

Composto	Curva de calibração	Coeficiente de correlação	Tempo de retenção (min)
Ácido gálico	$C = 8,88965 \cdot 10^{-7} \times A$	0,999929	2,3275
5-hidroximetilfurfural	$C = 4,46851 \cdot 10^{-7} \times A$	0,988973	3,0467
Ácido furóico	$C = 6,16813 \cdot 10^{-6} \times A$	0,998684	4,1400
Álcool vanilil	$C = 2,70909 \cdot 10^{-6} \times A$	0,999621	4,3500
Furfural	$C = 3,21925 \cdot 10^{-7} \times A$	0,997765	4,9368
Pirocatecol	$C = 1,84601 \cdot 10^{-6} \times A$	0,999095	5,3900
Ácido vanílico	$C = 1,34989 \cdot 10^{-6} \times A$	0,999635	8,3528
Ácido siríngico	$C = 7,57432 \cdot 10^{-7} \times A$	0,999507	9,6550
Vanilina	$C = 6,64228 \cdot 10^{-7} \times A$	0,999850	13,0564
Siringaldeído	$C = 1,68111 \cdot 10^{-6} \times A$	0,999622	16,4189
Ácido <i>p</i> -cumárico	$C = 5,90316 \cdot 10^{-7} \times A$	0,999898	17,8523
Ácido ferúlico	$C = 9,53159 \cdot 10^{-7} \times A$	0,999823	24,2128

5.3. Caracterização química da palha de arroz

Os dados de caracterização química da palha de arroz estão reunidos na Tabela 5.3 e, entre eles, estão os teores percentuais de componentes estruturais (celulose, hemicelulose, lignina e grupos acetil) bem como de componentes não estruturais (cinzas e outros) (CASTRO, 2012).

Tabela 5.3 - Caracterização química da palha de arroz *in natura* (CASTRO, 2012).

Componentes	Palha de arroz <i>in natura</i> (%p/p)
Celulose	35,10 ± 0,61
Hemicelulose	25,93 ± 0,51
Grupos acetil	1,50 ± 0,06
Lignina insolúvel	14,72 ± 2,85
Lignina solúvel	5,13 ± 0,02
Cinzas	9,75 ± 0,03
Outros	3,39 ± 0,04

Assim como Singh e Bishnoi (2012), a análise química da palha de arroz neste trabalho revelou que a celulose é correspondente à maior fração da palha de arroz, seguida da hemicelulose. Os autores encontraram valores de 43% para celulose e 23% para hemicelulose e o teor de lignina insolúvel encontrado por eles, 10,2%, foi inferior àquele encontrado neste trabalho. Já em relação às cinzas, os autores encontraram valores superiores, que atingiram 18,8%.

As diferenças encontradas na composição química da palha de arroz relatada por diferentes autores podem ser justificadas por diversos fatores, como diferenças intrínsecas aos cultivares, condições de cultivo, condições climáticas, tempo de colheita, bem como condições de armazenamento do material (PARK et al., 2011).

A palha de arroz apresenta alto teor de cinzas quando comparada a outras culturas, como a palha de trigo, por exemplo (3%). Este valor elevado está relacionado ao alto teor de sílica característico deste resíduo agrícola, o qual pode atingir valores 75% (BINOD et al., 2010).

5.4. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz quanto ao teor de açúcares e compostos com potencial inibidor do metabolismo microbiano

A Tabela 5.4 apresenta a composição em açúcares do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtido por hidrólise ácida.

Tabela 5.4 - Composição de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtido por hidrólise ácida, não concentrado e concentrado.

Açúcar	Concentração (g.L ⁻¹)		Fator de concentração
	Hidrolisado não concentrado	Hidrolisado concentrado	
Xilose	13,680	86,919	6,35
Glicose	2,307	15,139	6,56
Arabinose	2,914	18,240	6,25

Nota-se que a quantidade de xilose obtida no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foi 5,9 vezes superior à concentração de glicose e 4,7 vezes superior à concentração de arabinose. Observando estes dados, é possível inferir que houve fracionamento seletivo da fração hemicelulósica da palha de arroz por meio do processo de hidrólise ácida, devido aos altos teores de xilose liberados quando comparados à glicose. Estas proporções se mantiveram após a concentração do hidrolisado, um processo que atingiu sua finalidade de aumentar as concentrações iniciais de açúcares para posterior fermentação.

Levando em consideração que 25,9% da palha de arroz seca correspondem à fração hemicelulósica, e sabendo-se que a hemicelulose corresponde à fração de pentosanas (xilose + arabinose) presente na matéria prima, pode-se estimar que, nas condições de hidrólise empregadas, foi alcançada uma recuperação de pentosanas da ordem de 64% do total destes açúcares no hidrolisado.

A hidrólise de materiais vegetais visando à liberação de açúcares solúveis para o processo fermentativo libera, concomitantemente, compostos inibidores ao desenvolvimento microbiano, cujas concentrações variam em função do tipo e da severidade do tratamento de hidrólise utilizado (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGRAM, 2000).

No presente trabalho, a hidrólise da palha de arroz com ácido diluído liberou compostos inibidores em concentrações variáveis, como apresentado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Caracterização dos compostos com potencial inibidor presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

Composto	Concentração (g.L ⁻¹)		Fator de concentração
	Hidrolisado não concentrado	Hidrolisado Concentrado	
5-HMF	0,112	0,614	5,50
Furfural	0,089	0,115	1,29
Vanilina	0,008	0,049	6,12
Siringaldeído	nd	0,013	-
Ácido ferúlico	0,111	0,877	7,90
Ácido <i>p</i>-cumárico	0,139	0,258	1,86
Ácido acético	1,445	1,909	1,32

Levando em consideração que 1,5% da palha de arroz seca correspondem à fração de grupos acetil, pode-se estimar que, com as condições de hidrólise empregadas, foi atingida uma liberação de 96,3% do total destes grupamentos para o hidrolisado neste trabalho. Um comportamento semelhante também foi observado por Guo et al. (2008), que obtiveram uma liberação de 90% dos grupos acetil presentes na palha de arroz com o uso de tratamentos severos.

Nota-se que, diferentemente dos açúcares, a concentração destes compostos não foi proporcional ao fator de concentração, indicando um grau de volatilidade que variou conforme o composto analisado. Os compostos que apresentaram menor fator de concentração foram furfural e ácido acético, por serem mais voláteis, enquanto ácido ferúlico e HMF apresentaram os maiores fatores de concentração por serem os menos voláteis. De fato, Nigam (2001), ao avaliar a concentração do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo, encontrou um comportamento semelhante. O autor verificou que xilose, glicose e arabinose apresentaram fatores de concentração de 3,5, 3,8 e 3,5, respectivamente, enquanto o furfural foi concentrado apenas em um fator de 1,8 vezes e o ácido acético, 2,6 vezes.

5.5. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte quanto ao teor de açúcares e compostos com potencial inibidor do metabolismo microbiano

A Tabela 5.6 apresenta a composição em açúcares do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte previamente obtido por hidrólise ácida.

Tabela 5.6 - Composição de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte obtido por hidrólise ácida, concentrado.

Açúcar	Concentração (g.L⁻¹)
Xilose	76,578
Glicose	11,842
Arabinose	38,104

Nota-se que, semelhante ao hidrolisado de palha de arroz, a quantidade de xilose obtida no hidrolisado de bagaço de malte também foi superior àquela de glicose, em um fator de 6,5 vezes. Isto indica que a metodologia de hidrólise com ácido diluído empregada foi eficiente no fracionamento seletivo da porção hemicelulósica do material. A concentração de xilose foi 2 vezes maior que a de arabinose no hidrolisado hemicelulósico, o que está de acordo com análises feitas por Mussatto e Roberto (2005) que encontraram xilana e arabinana como sendo os principais constituintes da porção hemicelulósica deste material, correspondendo a 70 e 30% da biomassa, respectivamente. Por consequência, estes açúcares são os principais constituintes do hidrolisado hemicelulósico obtido.

Além de açúcares, foi observada também a liberação de compostos com potencial inibitório para o metabolismo de micro-organismos, os quais estão representados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Caracterização dos compostos com potencial inibidor presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte.

Composto	Concentração (g.L ⁻¹)		Fator de concentração
	Hidrolisado não Concentrado*	Hidrolisado Concentrado	
5-HMF	0,070	0,115	1,64
Furfural	0,220	0,190	0,86
Vanilina	nd	0,022	-
Siringaldeído	nd	0,011	-
Ácido ferúlico	nd	0,120	-
Ácido <i>p</i>-cumárico	nd	0,079	-
Ácido acético	2,92	2,685	0,92

(*Fonte: GARCIA, 2012).

Assim como observado para o hidrolisado de palha de arroz e por Nigam (2001), os níveis de concentração dos inibidores foram diferenciados devido à sua volatilidade, como se observa principalmente para o furfural e o ácido acético, que tiveram suas concentrações ligeiramente diminuídas. Alguns dos inibidores, como a vanilina, o siringaldeído, o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico, não foram detectados no hidrolisado não concentrado, e por isto suas concentrações são relativamente baixas no hidrolisado concentrado quando comparadas às dos outros inibidores.

5.6. Impacto individual dos compostos inibidores sobre o comportamento da levedura *Pichia stipitis* em meio semissintético

O uso de meio semissintético permite avaliar os impactos de compostos inibitórios na fisiologia de micro-organismos em concentrações conhecidas, individualmente ou em combinações (KELLY et al., 2008). O conhecimento sobre o comportamento da levedura diante da presença destes compostos no meio de fermentação permite a elaboração de estratégias para aperfeiçoar o processo fermentativo, por exemplo, por fornecer informações sobre quais compostos são mais prejudiciais ao desenvolvimento da levedura e à produção de etanol e, portanto, devem ser priorizados em processos de destoxificação.

5.6.1. Ácido acético

O efeito do ácido acético sobre a fermentação por *Pichia stipitis* foi avaliado por meio da sua adição ao meio de fermentação nas concentrações iniciais de 1,5 g.L⁻¹, 2,0 g.L⁻¹, 2,5 g.L⁻¹, 3,5 g.L⁻¹ e 4,5 g.L⁻¹. Os perfis cinéticos, obtidos em 30 horas de cultivo, referentes ao consumo de açúcares, variação de pH, produção de biomassa e produção de etanol estão representados nas Figuras 5.6 e 5.7.

É possível observar na Figura 5.6A que a presença de ácido acético prejudicou o consumo de açúcares pela levedura *Pichia stipitis* em todas as concentrações avaliadas. Observa-se que, no ensaio controle sem o inibidor, os açúcares foram completamente consumidos após 30 horas de fermentação, enquanto que na presença de ácido acético foi encontrado açúcar residual, o qual variou entre 15,6% e 60,7%. Nota-se que o residual de xilose foi dependente da concentração inicial do ácido adicionado ao meio, pois quanto maior a concentração inicial deste composto no meio de cultivo, menor foi a capacidade da levedura de consumir os açúcares quando comparada ao controle. O mesmo comportamento foi observado por Bellido et al. (2011), pois em ensaios empregando *Pichia stipitis* DSM 3651 visando a obtenção de etanol a partir de 50 g.L⁻¹ de glicose e xilose, foi constatado a levedura não foi capaz de metabolizar todo o açúcar disponível no meio após 168 h de fermentação na presença de 1,5 e 2,5 g.L⁻¹ de ácido acético, o que não foi observado no controle. Eles também observaram que o aumento da concentração inicial de ácido acético no meio levou a maiores efeitos inibitórios. Díaz et al. (2009) obtiveram comportamentos semelhantes sobre o consumo de açúcares por *P. stipitis* em meio contendo ácido acético nas concentrações iniciais de 3 g.L⁻¹ e 6 g.L⁻¹. Os autores relataram que no ensaio controle, sem inibidor, foi observado o completo consumo de 20 g.L⁻¹ de glicose em 12 h, enquanto a presença de 3 g.L⁻¹ de ácido acético prolongou este tempo para 24 h e, com 6 g.L⁻¹ do ácido, foram 72 h para consumo total deste açúcar. A não utilização total de açúcares pode estar relacionada a falhas no transporte dos mesmos para o interior da célula. Segundo Kilian e van Uden (1988), a glicose e a xilose são transportadas por dois sistemas de simporte de prótons, um de baixa afinidade, compartilhado pelos dois açúcares, e um de alta afinidade, o qual transporta apenas xilose. A presença de um ácido fraco como o

Figura 5.6 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido acético em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem ácido acético (—■—), 1,5 g.L^{-1} (—●—), 2,0 g.L^{-1} (—▲—), 2,5 g.L^{-1} (—▼—), 3,5 g.L^{-1} (—◆—) e 4,5 g.L^{-1} (—◆—) de ácido acético.

ácido acético no meio de cultivo pode ter prejudicado o funcionamento destes sistemas, o que ocasionou acúmulo de substrato ao final da fermentação.

O monitoramento do pH, representado na Figura 5.6B, permite observar que a presença de ácido acético no meio de fermentação promove um efeito tamponante, o qual não foi observado no controle sem este composto. Nota-se que no controle houve uma queda de aproximadamente 1,5 unidades de pH, diferentemente dos ensaios na presença de ácido acético, nos quais o pH do meio se manteve praticamente constante, com uma leve variação positiva de 0,26 unidades de pH, em média. Pereira, Mussatto e Roberto (2011) observaram um comportamento semelhante com relação ao pH ao cultivarem a levedura *Candida guilliermondii* na presença ou ausência de ácido acético. Segundo os autores, em meios não tamponados o pH caiu de 5,5 para aproximadamente 3,0 devido à liberação de ácidos livres em decorrência do consumo de amônia pela levedura. Já na presença de ácido acético, o pH final foi de 4,0, o que indica, de acordo com os autores, que este ácido apresenta capacidade tamponante em valores de pH entre 5,0 e 5,5. O controle do pH em cultivos de micro-organismos na presença de ácido acético é um fator importante pois, segundo Lawford e Rousseau (1993), o pH do meio de fermentação, quando mantido em valores superiores àqueles do pKa do ácido acético ($pK_a = 4,75$), configura uma maneira de manter a maior parte das moléculas em sua forma dissociada, a qual não é solúvel nos lipídeos de membrana do micro-organismo e, conseqüentemente, tem sua entrada na célula dificultada, o que pode diminuir os danos deste composto às células. Van Zyl, Prior e du Preez (1991) avaliaram o efeito de 10 g.L^{-1} de ácido acético sobre o metabolismo de *Pichia stipitis* em pH inicial de 5,1 e 6,5 e, de fato, relataram que a produção de etanol foi totalmente inibida em pH 5,1, enquanto houve apenas inibição parcial em pH 6,5.

Quanto à biomassa, cujo perfil cinético está representado na Figura 5.7A, nota-se uma diminuição na sua formação em todas as concentrações de ácido acético avaliadas neste trabalho e que, quanto maior a concentração inicial deste composto no meio de fermentação, maior o impacto negativo sobre a massa final de células. Verifica-se que, no controle, foram obtidos $16,2 \text{ g.L}^{-1}$ de células após 30 h, enquanto que a presença de apenas $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético houve uma queda de 9,3% em relação a este valor. O aumento de concentração inicial do ácido para $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ gerou uma queda ainda maior na produção de biomassa, de

Figura 5.7 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido acético em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem ácido acético (—■—), 1,5 g.L⁻¹ (—●—), 2,0 g.L⁻¹ (—▲—), 2,5 g.L⁻¹ (—▼—), 3,5 g.L⁻¹ (—◆—) e 4,5 g.L⁻¹ (—◆—) de ácido acético.

28%, enquanto na concentração de $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ foi observada uma redução de 57,5% da biomassa total em relação ao controle. Bellido et al. (2011) observaram um comportamento semelhante a respeito do impacto individual de ácido acético sobre a produção de biomassa por *Pichia stipitis*, pois o aumento da concentração inicial do composto no meio resultou em ampliação da inibição sobre o crescimento da levedura. Os autores relataram que o ácido acético na concentração inicial de $3,5 \text{ g.L}^{-1}$ inibiu por completo o crescimento da levedura, um comportamento distinto daquele observado no presente trabalho, pois observa-se na Figura 5.7A que a levedura exibiu crescimento, ainda que lento, mesmo nas maiores concentrações iniciais de ácido acético empregadas, como $4,5 \text{ g.L}^{-1}$. Esta discrepância pode ser atribuída à diferença no pH inicial do meio de fermentação, uma vez que os autores daquele trabalho optaram por um pH de 5,0 enquanto no presente trabalho o pH utilizado foi de 5,5, um valor superior e mais distante do valor de pKa do ácido acético. Isto pode ter ocasionado em menor número de moléculas na sua forma não dissociada e, conseqüentemente, menos moléculas hábeis a invadir as células de levedura por meio da solubilização na membrana plasmática, possivelmente diminuindo o potencial tóxico do ácido. Desta forma, a utilização de concentrações iniciais de ácido acético idênticas pode levar a resultados diferentes sobre o metabolismo da levedura. Cho et al. (2010) avaliaram o efeito do ácido acético sobre o crescimento de *P. stipitis* nas concentrações iniciais de 0,7 e $7,1 \text{ g.L}^{-1}$, em meio com pH inicial de 6,0. Os autores observaram que ambas as concentrações prejudicaram a produção de biomassa pela levedura, sendo que no maior nível testado esta produção foi de 71% em relação ao controle.

A produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* em diferentes concentrações iniciais de ácido acético também sofreu impacto negativo, como pode ser observado na Figura 5.7B. A produção máxima no controle, de $20,2 \text{ g.L}^{-1}$, foi atingida no tempo de 24 horas, enquanto que na presença do ácido acético em todas as concentrações empregadas o máximo foi atingido apenas com 30 horas de fermentação e com valores inferiores àquele obtido para o controle. A presença do inibidor no menor nível testado levou a uma produção de etanol de 89,9% relativa ao controle, já no maior nível, $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético, esta produção atingiu apenas 28,9% daquela obtida no controle. Assim como foi observado para o consumo de açúcares e formação de biomassa, o aumento

gradativo da concentração inicial de ácido acético no meio levou ao crescimento do efeito inibitório sobre a formação do produto de interesse. Bellido et al. (2011) observaram um comportamento semelhante ao avaliarem a influência do ácido acético sobre a produção de etanol por *P. stipitis* em concentrações iniciais de 0,5, 1,5 e 2,5 g.L⁻¹, obtendo produções máximas de etanol de 78,9%, 76,7% e 45,6% em relação ao controle, respectivamente. Na presença de 3,5 g.L⁻¹ deste ácido no meio, os autores relataram que não houve produção alguma de etanol. Mais uma vez, nota-se que o efeito inibitório relatado por estes autores foi maior que aquele observado no presente trabalho, mesmo em concentrações semelhantes. Isto pode ser atribuído ao pH inicial do meio de fermentação empregado pelos autores, como descrito anteriormente, como também pela cepa de *P. stipitis* utilizada (DSM 3651), a qual pode apresentar menor tolerância à presença do ácido acético quando comparada com aquela empregada no presente trabalho (NRRL Y-7124). Cho et al. (2010) observaram que a presença de ácido acético no meio de fermentação nas concentrações iniciais de 0,7 e 7,1 g.L⁻¹ levaram, respectivamente, à não alteração da produção de etanol e a uma queda de 51% com relação ao controle. Neste caso, os autores utilizaram a levedura *P. stipitis* KCCM 12009 e o pH inicial do meio de fermentação foi de 6,0, o que pode ter minimizado o efeito inibitório do ácido acético sobre o metabolismo fermentativo da levedura. Em estudos realizados por van Zyl, Prior e du Preez (1991), foi avaliado o efeito do ácido acético em diferentes concentrações iniciais e diferentes valores de pH (6,5 e 5,1) do meio de cultivo sobre a produção de etanol por *P. stipitis* CSIR-Y633 (CBS 7126) e, de modo geral, os autores constataram que a produção de etanol foi mais fortemente prejudicada no pH de 5,1 que no de 6,5, mesmo em concentrações iniciais de ácido acético semelhantes. Os autores ressaltaram ainda que existem complicações ao comparar-se estudos de diferentes autores com *P. stipitis* ou outros micro-organismos, devido à diversidade de condições de meio empregadas, o que inclui distintos valores de pH inicial do meio de cultivo.

Quanto ao ácido acético presente no meio de fermentação, o perfil cinético do seu consumo pode ser observado na Figura 5.8A. Nota-se que houve consumo do ácido acético adicionado ao meio de fermentação pela levedura *Pichia stipitis* em todas as concentrações avaliadas, ainda que não tenham sido observados produtos metabólicos provenientes de sua bioconversão. No entanto,

o consumo total deste ácido ocorreu apenas quando sua concentração inicial foi de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, ou seja, no menor nível testado. Para todas as outras concentrações testadas, a média de consumo do ácido acético foi de $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ após 30 h, o que corresponde a uma taxa média de $0,05 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, o que indica que é o tempo de exposição da levedura ao ácido que interfere no seu consumo, e não sua concentração inicial no meio de cultivo. Para melhor demonstrar este efeito, a Figura 5.8B representa a taxa de consumo do ácido acético adicionado ao meio, em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, em função do tempo. Esta taxa foi dada pela derivada das curvas apresentadas na Figura 5.8B, e cada ponto representa a taxa de consumo instantânea do ácido pela levedura. Nota-se que, de um modo geral, a taxa de consumo se manteve entre $0,04$ e $0,06 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, principalmente após 8 horas de cultivo, para todas as concentrações iniciais de ácido acético avaliadas, sendo um pouco mais lentas no início do processo fermentativo. Para demonstrar que a taxa de consumo é constante e similar em todas as concentrações de ácido acético avaliadas, os dados foram submetidos a uma regressão linear, e a representação gráfica dos dados obtidos encontra-se na Figura 5.9, e os coeficientes lineares e angulares das retas provenientes deste ajuste estão reunidas na Tabela 5.8, bem como os respectivos coeficientes de correlação. Nota-se que foi possível obter um ajuste linear dos dados experimentais, pois foram obtidos valores de coeficiente de correlação da ordem de $0,9$ para todas as concentrações iniciais de ácido avaliadas. Tendo em vista a adequação deste ajuste, a assimilação do ácido acético pela levedura durante o processo pode ser considerado constante, e o coeficiente angular das retas obtidas corresponde à taxa deste consumo. Ao observar a Tabela 5.8, nota-se que os dados referentes aos coeficientes angulares obtidos são, em média, $0,05 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, ou seja, a taxa de consumo do ácido acético é constante e seu valor independe da concentração inicial do ácido no meio de fermentação. Estes dados demonstram que a levedura *Pichia stipitis* possivelmente possui um sistema de assimilação do ácido acético limitado a taxas de conversão da ordem de $0,05 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ independentemente da concentração inicial utilizada.

Figura 5.8 - Cinética de consumo de ácido acético (A) e taxas instantâneas de consumo de ácido acético (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido acético em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 1,5 g.L⁻¹ (—●—), 2,0 g.L⁻¹ (—▲—), 2,5 g.L⁻¹ (—▼—), 3,5 g.L⁻¹ (—◆—) e 4,5 g.L⁻¹ (—▶—) de ácido acético.

Figura 5.9 - Regressão linear dos dados de cinética de consumo de ácido acético por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido acético em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 1,5 g.L⁻¹ (●), 2,0 g.L⁻¹ (▲), 2,5 g.L⁻¹ (▼), 3,5 g.L⁻¹ (▲) e 4,5 g.L⁻¹ (▲) de ácido acético.

Tabela 5.8 - Coeficientes lineares, angulares e de correlação obtidos pela regressão linear dos dados de cinética de consumo de ácido acético em diferentes concentrações iniciais pela levedura *Pichia stipitis*.

Concentração inicial de ácido acético (g.L ⁻¹)	Coeficiente linear	Coeficiente angular	Coeficiente de correlação
1,5	1,610 (±0,038)	-0,0557 (±0,002)	0,9907
2,0	2,100 (±0,051)	-0,0584 (±0,003)	0,98518
2,5	2,667 (±0,060)	-0,0592 (±0,003)	0,97981
3,5	3,695 (±0,052)	-0,0538 (±0,003)	0,98151
4,5	4,608 (±0,085)	0,0445 (±0,005)	0,93161

De acordo com Delgenes, Moletta e Navarro (1996), o metabolismo do ácido acético em leveduras fermentadoras de xilose deve ocorrer por meio de um mecanismo semelhante àquele presente em leveduras do gênero *Saccharomyces*, o qual consiste na ação da enzima acetil-CoA sintetase e, subsequentemente, ciclos do ácido cítrico e do glioxilato. Estes autores relataram que a levedura *Pichia stipitis*, em meio de fermentação contendo 20 g.L⁻¹ de xilose e com 15 g.L⁻¹ de ácido acético, consumiu apenas 18% do acetato inicial após um longo tempo de incubação de 96 horas. Van Zyl, Prior e du Preez (1991) avaliaram a assimilação de 10 g.L⁻¹ ácido acético pela levedura *P. stipitis* em diferentes condições de aeração. Os autores relataram que, em condições aeróbias, o ácido acético foi consumido simultaneamente com a xilose utilizada como fonte de carbono, a qual foi majoritariamente direcionada para a produção de células e não de etanol. Por outro lado, em condições de fornecimento limitado de oxigênio, houve apenas um consumo limitado do ácido e, em condições de anaerobiose, não foi observado consumo do ácido acético do meio. Este comportamento está de acordo com aquele observado no presente trabalho, no qual foram empregadas condições mínimas de aeração, as quais favorecem a formação de etanol em detrimento a biomassa, e foi observado consumo parcial do ácido acético quando em maiores concentrações.

Diante de todas estas informações, os dados sobre o efeito do ácido acético em diferentes concentrações sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* com vistas à produção de etanol podem ser sumarizados como dados relativos ao controle sem o inibidor, para melhor comparar o efeito sobre cada parâmetro de interesse, os quais são consumo de açúcares, produção máxima de etanol e formação máxima de biomassa pela levedura. Estes dados estão apresentados numericamente na Tabela 5.9 e, graficamente, na Figura 5.10. Nota-se que o impacto do ácido acético sobre todos os fatores avaliados foi semelhante quando comparado com o controle sem inibidor. Este resultado não está de acordo com aquele observado por Palmqvist e Hahn-Hagerdal (2000), que descreveram um mecanismo metabólico de tolerância ao *stress* ácido por *Saccharomyces cerevisiae*, no qual o impacto negativo da presença do ácido acético incide primariamente sobre a produção de biomassa quando comparada com a produção de etanol. Isto leva a crer que leveduras de espécies diferentes apresentam mecanismos metabólicos distintos para lidar com *stress*.

Tabela 5.9 - Efeito do ácido acético sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por *Pichia stipitis*.

Concentração inicial de ácido acético (g.L ⁻¹)	% Relativa ao Controle		
	Consumo de substrato	Produção máxima de etanol	Formação máxima de biomassa
0	100	100	100
1,5	84,4	89,8	90,7
2,0	77,1	77,1	80,0
2,5	70,1	62,8	72,0
3,5	51,7	53,3	52,4
4,5	39,3	28,8	42,5

Figura 5.10 - Efeito do ácido acético relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—×—).

Observa-se ainda, pela Figura 5.10, que o aumento na concentração inicial de ácido acético claramente levou a um gradativo crescimento no efeito inibitório sobre o metabolismo fermentativo da levedura nos três fatores avaliados. Este comportamento está em concordância com aquele observado por diversos outros autores (BELLIDO et al., 2011; CHO et al., 2010; VAN ZYL, PRIOR e DU PREEZ, 1991).

Com base nos dados apresentados, é possível afirmar que o impacto negativo da presença do ácido acético sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* incide sobre todos os aspectos avaliados, em um grau dependente da concentração inicial, ainda que esta levedura seja capaz de metabolizar este composto do meio de fermentação. Após estas análises, a Tabela 5.10 sumariza o impacto do ácido acético sobre os parâmetros fermentativos obtidos neste trabalho.

Tabela 5.10 - Efeito do ácido acético sobre os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.

Ensaio	Parâmetros Fermentativos					
	Consumo de açúcares (%)	Produção de etanol* (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	η (%)
Controle	99,7 (±0,341)	20,2 (±1,56)	0,38 (±0,011)	0,25 (±0,037)	0,84 (±0,065)	75,0 (±2,2)
1,5 g.L⁻¹	84,2 (±0,910)	18,1 (±2,05)	0,37 (±0,043)	0,27 (±0,003)	0,60 (±0,068)	72,7 (±8,5)
2,0 g.L⁻¹	76,9 (±0,821)	15,6 (±2,57)	0,36 (±0,049)	0,27 (±0,007)	0,52 (±0,086)	70,2 (±9,6)
2,5 g.L⁻¹	69,9 (±1,675)	12,7 (±0,58)	0,32 (±0,034)	0,27 (±0,012)	0,42 (±0,019)	61,8 (±6,6)
3,5 g.L⁻¹	51,5 (±0,288)	10,8 (±2,28)	0,36 (±0,075)	0,26 (±0,008)	0,36 (±0,076)	70,6 (±14)
4,5 g.L⁻¹	39,2 (±1,750)	5,8 (±0,12)	0,30 (±0,015)	0,27 (±0,010)	0,19 (±0,004)	58,6 (±3,0)

* Valores considerando a produção máxima obtida, a qual foi em 24 horas para o controle e 30 horas para os demais.

Como já foi demonstrado anteriormente, o consumo de açúcares foi diminuído em todas as concentrações de ácido acético empregadas, atingindo apenas 39,2% de consumo do açúcar inicial na presença de $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético no meio de fermentação. O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) se manteve aproximadamente constante ($Y_{X/S}$ em torno de $0,27 \text{ g/g}$) e semelhante ao controle em todas as condições avaliadas na presença de ácido acético, apesar da diminuição da biomassa total formada (Figura 5.7A), o que pode ser explicado devido ao fato de tanto a produção celular quanto o consumo de açúcares terem diminuído com o aumento da concentração de ácido acético no meio de fermentação.

Conforme a Figura 5.7B, a produção máxima de etanol também foi reduzida em todas as condições avaliadas, sendo esta redução cada vez maior à medida que a concentração de ácido acético no meio de fermentação foi aumentada. Este decréscimo produziu um efeito negativo na produtividade da levedura (Q_P), a qual diminuiu de $0,84 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para $0,19 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ à medida que a concentração inicial de ácido acético aumentou de zero para $4,5 \text{ g.L}^{-1}$. O mesmo efeito foi observado por Bellido et al. (2011), estudando a produção de etanol por *Pichia stipitis* em misturas de glicose (35 g.L^{-1}) e xilose (20 g.L^{-1}) em meio com pH inicial de 5,0. Os autores relataram que a produtividade após o consumo total de glicose, que se deu em 24 h, foi de $0,61 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para o controle, e que este valor caiu para $0,57$ e $0,15 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ na presença de $0,5$ e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético no meio de fermentação, respectivamente. Ou seja, o aumento de $1,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ na concentração da ácido (de $0,5$ para $1,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) resultou em um decréscimo de 74% na produtividade. No presente trabalho, o aumento da concentração inicial do ácido acético de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ para $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ resultou em uma queda de 30% no valor de produtividade. Possivelmente, a queda mais expressiva na produtividade observada por estes autores frente ao mesmo aumento na concentração inicial do ácido acético quando comparada com o presente trabalho é decorrente do valor de pH inicial utilizados por estes autores, o qual foi 0,5 unidade de pH menor que este. Isto pode implicar em aumento da toxidez do ácido, pois mais moléculas encontram-se na forma não dissociada, a qual é capaz de passar pela membrana do micro-organismo e alcançar o interior da célula.

O fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$) na presença de ácido acético mostrou valores similares ao controle, em torno de $0,34$. Isto ocorre pois,

ainda que a produção de etanol tenha sido reduzida em todos os níveis de ácido acético avaliados, esta produção se deu com uma menor taxa de consumo de açúcares quando comparada ao controle, o que consequentemente gera fatores de conversão com valores próximos, tendo em vista que este fator relaciona a produção de etanol ao consumo de açúcares. Bellido et al. (2011) também mostraram que o fator de conversão de substrato em produto não se alterou com a adição de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético ao meio, em torno de $0,39 \text{ g/g}$. Entretanto, ao contrário do observado no presente trabalho, este parâmetro foi aumentado para $0,44 \text{ g/g}$ quando a concentração de ácido acético foi aumentada para $1,5$ ou $2,5 \text{ g.L}^{-1}$. Os autores atribuem este aumento ao fato de que, ainda que a produção de etanol tenha sido reduzida, ela ocorreu com um consumo de açúcares expressivamente menor quando comparado ao controle. Cho et al. (2010) relataram que a presença de $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético não afetou o fator de conversão de glicose a etanol, o qual se manteve em torno de $0,4 \text{ g/g}$. Entretanto, eles observaram uma queda de 62% quando a concentração do ácido foi aumentada para $7,1 \text{ g.L}^{-1}$.

5.6.2. Furfural

Para avaliar o efeito do furfural sobre a fermentação alcoólica por *Pichia stipitis* em meio contendo glicose e xilose, este composto foi adicionado ao meio de fermentação nas concentrações iniciais de 12, 20, 43, 64 e 84 mg.L^{-1} . Os perfis cinéticos, obtidos em 30 horas de cultivo, referentes ao consumo de açúcares, variação de pH, produção de biomassa e produção de etanol estão representados nas Figuras 5.11 e 5.12.

Observa-se, na Figura 5.11A, que o consumo de açúcares por *Pichia stipitis* não foi afetado pela presença de furfural nas concentrações avaliadas. Em todos os níveis testados houve consumo total da glicose e da xilose após 30 horas de fermentação. Um comportamento diferente foi relatado por Bellido et al. (2011), os quais observaram que a presença de furfural em concentrações entre $0,5$ e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ resultou em um tempo mais elevado para o consumo de glicose e xilose quando comparado ao controle sem o composto. Os autores relataram ainda que a inibição no consumo de xilose ocorreu apenas na concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$, não sendo observado residual deste açúcar nas concentrações menores

Figura 5.11 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de furfural em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem furfural (—■—), 12 mg.L⁻¹ (—●—), 20 mg.L⁻¹ (—▲—), 43 mg.L⁻¹ (—▼—), 64 mg.L⁻¹ (—◆—) e 84 mg.L⁻¹ (—▼—) de furfural.

avaliadas. A diferença entre o comportamento observado por estes autores e o presente trabalho pode ser explicada pelo fato de que as concentrações de furfural testadas por eles foram de 6 a 24 vezes superiores à maior concentração avaliada neste trabalho (84 mg.L^{-1}). Liu et al. (2004), estudando o efeito do furfural em concentrações iniciais entre $0,96$ e $11,5 \text{ g.L}^{-1}$ sobre o metabolismo fermentativo da levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, relataram que houve um atraso no início do consumo da glicose, o que não foi observado no presente trabalho. Entretanto, tendo em vista que esses autores também utilizaram concentrações de furfural muito superiores às aquelas empregadas no presente trabalho, a diferença de comportamentos pode ser justificada por este fato.

Quanto ao pH do meio de fermentação, seu perfil cinético está representado na Figura 5.11B. Nota-se que o pH do meio controle sofreu uma queda de 1,5 unidades de pH, ao passo que nos meios de fermentação contendo furfural em todas as concentrações avaliadas o decréscimo foi menor em uma unidade de pH. Esta diferença com relação ao controle é um indicativo de que podem ter ocorrido mudanças no metabolismo da levedura na presença do furfural, as quais alteraram o perfil de consumo e liberação de metabólitos de caráter ácido ou alcalino, o que promoveu esta diferença de comportamento do pH do meio quando comparado ao controle.

Com relação ao efeito do furfural no crescimento celular, nota-se pela Figura 5.12A que a presença deste furano provocou uma ligeira diminuição da biomassa total formada com relação ao controle. O impacto negativo na biomassa foi semelhante para todas as concentrações de furfural avaliadas, em torno de 10% de queda em relação ao controle e, desta forma, não foi possível estabelecer uma relação inversamente proporcional entre a concentração inicial do inibidor e a biomassa total formada. A única diferença no comportamento cinético de crescimento foi observada no maior nível testado, 84 mg.L^{-1} de furfural, onde ocorreu uma fase *lag* de 4 horas, ausente nas demais concentrações. Este mesmo comportamento foi observado por Liu et al. (2004), os quais observaram que a presença de furfural no meio de fermentação em concentrações iniciais de $0,96$ e $2,9 \text{ g.L}^{-1}$ gerou uma fase *lag* de 4 e 24 horas, respectivamente, no crescimento de *Pichia stipitis*. Os autores observaram ainda que, em concentrações a partir de $5,8 \text{ g.L}^{-1}$, a levedura não apresentou qualquer crescimento. Estudando a fermentação de xilose por *Pichia stipitis* na presença de

furfural na concentração inicial de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$, Delgenes, Moletta e Navarro (1996) relataram que o crescimento da levedura atingiu apenas 1% em relação ao controle. Diversos autores associam o aumento na fase *lag* do crescimento da levedura com uma adaptação da mesma ao *stress* oxidativo gerado pela presença de furfural no meio de fermentação (BELLIDO et al., 2011; SLININGER; GORSICH; LIU, 2009; LIU et al., 2004; DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996). Estes autores argumentam que a levedura necessita remover o furfural do meio, usualmente reduzindo-o a um álcool, menos reativo que a função aldeído e, conseqüentemente, menos tóxico para a célula, para então recuperar o seu crescimento. Isto justifica o fato de que, quanto maior a concentração inicial de furfural adicionada ao meio, maior será a fase *lag* de crescimento, pois a levedura levará mais tempo para realizar a bioconversão do composto.

Quanto à produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* na presença de furfural nota-se, pela observação da Figura 5.12B, que a máxima produção atingida pelo controle foi de $20,2 \text{ g.L}^{-1}$ em 24 horas. Por outro lado, a presença de furfural no menor nível testado, 12 mg.L^{-1} , resultou em um ligeiro estímulo da produção de etanol, com aumento de 13% em relação ao controle. Entretanto, isto ocorreu apenas após 30 horas de fermentação. Nos níveis intermediários, a produção máxima foi semelhante ao controle, sendo atingida em 24 horas nas concentrações iniciais de furfural de 20 e 64 mg.L^{-1} e em 30 horas na concentração inicial de 43 mg.L^{-1} . Em contrapartida, com o aumento da concentração inicial do furano para 84 mg.L^{-1} , observa-se um perfil de produção semelhante àquele obtido no controle, com o máximo da produção em 24 horas, mas houve uma queda de 16% em relação ao controle. Desta forma, nota-se que o furfural em baixa concentração promoveu um ligeiro estímulo à produção de etanol, enquanto concentrações intermediárias não alteraram o máximo da produção e, no maior nível foi observado decréscimo da produção. Bellido et al. (2011), ao avaliarem a produção de etanol por *Pichia stipitis* na presença de diferentes concentrações iniciais de furfural, observaram que a produção máxima de etanol atingiu valores semelhantes ao do controle, porém a produção foi mais lenta, o que acarretou em prejuízo nos valores de produtividade. Para o controle, a produção máxima foi de $22,8 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol a partir de uma mistura de 30 g.L^{-1} de glicose e 20 g.L^{-1} de xilose, enquanto a adição de 0,5, 1,0 e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural

Figura 5.12 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de furfural em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem furfural (—■—), 12 mg.L⁻¹ (—●—), 20 mg.L⁻¹ (—▲—), 43 mg.L⁻¹ (—▼—), 64 mg.L⁻¹ (—◀—) e 84 mg.L⁻¹ (—▶—) de furfural.

ao meio de fermentação resultou em produções máximas de 21,6, 21,6 e 21,0 g.L⁻¹ de etanol. Delgenes, Molleta e Navarro (1996) observaram em seus estudos com a levedura *P. stipitis*, visando a obtenção de etanol a partir de xilose, que a produção máxima de etanol para o controle foi obtida em 32 horas de fermentação e, neste tempo, a presença de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ de furfural no meio de fermentação resultou em uma produção de etanol de 71%, 29% e 5% em relação ao controle. Entretanto, os autores relataram que quando a levedura foi exposta a períodos mais longos de fermentação, de 92 horas, ela foi capaz de se aclimatar e produzir quantidades significativas de etanol, mesmo no maior nível de furfural avaliado. O comportamento observado por estes autores é semelhante ao apresentado neste trabalho. Segundo Slininger, Gorsich e Liu (2009), o impacto negativo sobre a produção de etanol pela levedura na presença de furfural pode ser atribuído à inibição de enzimas como álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase e piruvato desidrogenase, o que gera um bloqueio do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e da produção de etanol, acumulando acetaldeído na célula, que é tóxico. Além disso, os autores relatam que as enzimas e cofatores que direcionam o fluxo de carbono para o crescimento e produção de etanol atuam também em um mecanismo de destoxificação utilizado pela levedura, o que gera uma espécie de competição por sua atividade. Este mecanismo consiste na redução do grupamento aldeído, altamente reativo, a álcool.

O perfil cinético de assimilação de furfural por *Pichia stipitis* durante o processo fermentativo está representado na Figura 5.13. Observa-se que, independentemente da concentração inicial deste furano adicionado ao meio de cultivo, este composto foi assimilado pela levedura em um período de 4 horas, quando foi possível observar apenas traços de furfural. De acordo com a literatura, o álcool furfurílico é o principal composto produzido por leveduras por meio da bioconversão do furfural em processos fermentativos (SLININGER; GORSICH; LIU, 2009), entretanto, no presente trabalho não foi detectada a presença de álcool furfurílico no meio de fermentação nas condições analíticas empregadas. Slininger, Gorsich e Liu (2009) relataram em seus estudos a redução do furfural em álcool furfuril por *Pichia stipitis* e, segundo os autores, a finalidade seria de converter o grupo aldeído altamente reativo em um grupamento álcool, menos reativo. Segundo os mesmos autores, o mecanismo

utilizado para esta redução compete por enzimas chave no fluxo de carbono para a produção de etanol.

Figura 5.13 - Cinética de consumo de furfural por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de furfural em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 12 mg.L⁻¹ (●), 20 mg.L⁻¹ (▲), 43 mg.L⁻¹ (▼), 64 mg.L⁻¹ (◆) e 84 mg.L⁻¹ (◆) de furfural.

Liu et al. (2004) também observaram a conversão de furfural em álcool furfurílico pela levedura *P. stipitis* e relataram ainda que o início do crescimento da levedura coincidiu com a assimilação total deste furano do meio de cultura. Bellido et al. (2011) e Delgenes, Moletta e Navarro (1996) também observaram assimilação total do furfural do meio de fermentação por *P. stipitis* em concentrações iniciais de até 2,0 g.L⁻¹. Estes autores também observaram que a taxa de assimilação aumentou à medida que a concentração inicial do composto foi maior. Nestes trabalhos, não foi analisada a formação de álcool furfurílico pela levedura.

A cinética de inibição enzimática como consequência da presença de furfural foi avaliada *in vitro* por Modig, Lidén e Taherzadeh (2002). Estes autores

relataram que o furfural é um inibidor competitivo da enzima álcool desidrogenase, a qual atua reduzindo acetaldeído a etanol com utilização de NADH mas, na presença do furfural, reduz também este composto a álcool furfurílico, ainda que a enzima apresente afinidade por acetaldeído 3 vezes maior que por furfural. Os autores descreveram que a inibição da atividade desta enzima pela presença de furfural é menos expressiva que a das enzimas aldeído desidrogenase e piruvato desidrogenase, as quais perderam mais de 90% da sua atividade na presença de 1 g.L^{-1} de furfural. A inibição da enzima aldeído desidrogenase, que atua na oxidação de acetaldeído a acetato utilizando NAD(P)H, também é competitiva, tendo em vista que esta enzima pode também catalisar a conversão de furfural a ácido furóico. Os autores relataram ainda que, apesar da afinidade da enzima ser maior para furfural do que para o acetaldeído, ambos os valores de K_M são muito baixos, indicando alta afinidade para ambos. No entanto, a velocidade máxima da reação para oxidação de acetaldeído é maior que para furfural, o que indica que, apesar de o furfural se ligar mais facilmente que o acetaldeído à enzima, seu desligamento é muito mais lento.

Quanto à formação preferencial de álcool furfurílico por leveduras durante processos fermentativos em detrimento da formação do produto de oxidação, o ácido furóico, Horváth et al. (2003) relataram que, para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o álcool furfurílico é o principal produto de conversão do furfural em condições fermentativas e respiro-fermentativas, enquanto o ácido furóico é aquele observado quando a levedura está em metabolismo respiratório.

Visando uma avaliação global dos resultados de fermentação por *Pichia stipitis* na presença de furfural, foi feito um estudo comparativo dos dados referentes ao consumo de açúcares, produção máxima de etanol e formação máxima de biomassa pela levedura. Estas informações, as quais são dados relativos ao controle sem furfural, estão apresentadas numericamente na Tabela 5.11 e, graficamente, na Figura 5.14. Nota-se, primeiramente, que a presença de furfural nas concentrações avaliadas neste trabalho não afetou o consumo de açúcares que, assim como no controle, foi totalmente consumido em todas as concentrações do inibidor avaliadas. Os dados da literatura mostram que o furfural apresenta impacto negativo proporcional à sua concentração inicial no meio de fermentação, resultando em um consumo mais lento dos açúcares, mas que após tempos prolongados de incubação a levedura é capaz de estabelecer

um consumo semelhante ao controle (BELLIDO et al., 2011; LIU et al. 2004). A diferença de comportamento observada entre o presente trabalho e os dados da literatura pode ser justificada pela discrepância nas concentrações iniciais de furfural avaliadas, como foi ressaltado anteriormente.

Quanto à produção máxima de etanol, observa-se pela Figura 5.14 que a presença de furfural no menor nível testado resultou em um ligeiro estímulo de 13% na produção de etanol em relação ao controle. Segundo Wahlbom e Hahn-Hägerdal (2002), a presença de furfural pode ser benéfica na fermentação de xilose a etanol por micro-organismos fermentadores de pentoses. Estes autores constataram em seus estudos que o cofator preferencial utilizado na redução de furfural a álcool furfuril é o NADH, o que implica que, na presença de furfural, a levedura é capaz de reoxidar o NAD⁺ necessário na reação de conversão de xilitol a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase, um dos passos iniciais na via de conversão de xilose a etanol, o que diminui o acúmulo de xilitol e favorece a produção de etanol. Isto significa, segundo os autores, que a adição de furfural ao meio em taxas semelhantes à sua taxa de redução pode favorecer a produção de etanol por parte da levedura, uma estratégia que pode ser explorada na fermentação de hidrolisados não destoxificados. Por outro lado, a presença do furano em concentrações intermediárias (20 a 64 mg.L⁻¹) não provocou nenhuma alteração na produção máxima de etanol, que manteve valores semelhantes ao controle ainda que estes tenham sido atingidos em tempos superiores a 24 horas. Observa-se ainda que, no maior nível de furfural avaliado, houve um decréscimo de 16% na produção de etanol com relação ao controle. Bellido et al. (2011) relataram um comportamento semelhante para *Pichia stipitis*, pois a levedura atingiu níveis de produção de etanol semelhantes ao do controle, porém após períodos mais prolongados de fermentação.

Com relação à produção de biomassa, nota-se uma diminuição de, em média, 9% em todas as concentrações iniciais de furfural avaliadas. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que as enzimas que direcionam o fluxo de carbono para o crescimento são direcionadas para a redução do furfural a álcool furfuril o que, segundo Slininger, Gorsich e Liu (2009), prejudicaria a formação de biomassa.

Tabela 5.11 - Efeito do furfural sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por *Pichia stipitis*.

Concentração inicial de furfural (mg.L ⁻¹)	% Relativa ao Controle		
	Consumo de substrato	Produção máxima de etanol	Formação máxima de biomassa
0	100	100	100
12	100,3	112,6	90,4
20	100,2	100,3	90,5
43	100,3	104,2	90,4
64	100,3	102,6	92,1
84	100,1	84,1	92,1

Figura 5.14 - Efeito do furfural relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—✕—).

De fato, Modig, Lidén e Taherzadeh (2002), ao estudarem a cinética de inibição das enzimas álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase e piruvato desidrogenase pela presença de furfural, observaram que as duas primeiras enzimas sofrem inibição competitiva na presença de furfural, enquanto para a terceira este tipo de inibição não se ajustou, pois o furfural não é reduzido por esta enzima, sendo a inibição não-competitiva um modelo mais adequado. A consequência da forte inibição das enzimas aldeído desidrogenase e piruvato desidrogenase quando comparada com a inibição da álcool desidrogenase é que a formação de biomassa deve ser mais sensível à presença de furfural que a produção de etanol. Isto ocorre pois este furano pode efetivamente parar ambas as vias que levam à formação de acetil-CoA a partir de piruvato, enquanto a via de conversão de piruvato a etanol deve ainda manter seu funcionamento a taxas apreciáveis. Estas vias estão esquematizadas na Figura 5.15.

Com base nos resultados discutidos anteriormente, é possível concluir que a presença de furfural no meio de fermentação nas concentrações avaliadas neste trabalho incidiu primariamente sobre o crescimento celular quando comparado com o consumo de açúcares e produção de etanol. Também não foi observada relação entre o impacto negativo e a concentração inicial do inibidor, o que pode ser devido às baixas concentrações iniciais de furfural empregadas quando comparadas àquelas descritas na literatura.

Na Tabela 5.12 estão apresentados os parâmetros fermentativos de conversão calculados para *Pichia stipitis* com vistas à produção de etanol na presença de diferentes concentrações de furfural.

Observa-se que não houve alteração no padrão do consumo de açúcares com a adição de furfural ao meio de fermentação independentemente da concentração inicial do inibidor, sendo os açúcares completamente consumidos após 30 horas de fermentação. De acordo com Díaz et al. (2009), a levedura *Pichia stipitis* não foi capaz de consumir os açúcares de uma mistura de 20 g.L⁻¹ de glicose e 15 g.L⁻¹ de xilose na presença de furfural, porém a concentração do inibidor utilizada pelos autores foi de 4 g.L⁻¹, um valor 48 vezes maior que a maior concentração empregada neste trabalho, o que pode justificar a diferença. Neste mesmo trabalho constatou-se que com a adição de 2 g.L⁻¹ de furfural ao meio de fermentação a levedura foi capaz de consumir todos os açúcares presentes, porém mais lentamente quando comparado ao experimento controle.

Figura 5.15 - Representação esquemática do efeito da presença de furfural sobre a atividade metabólica de leveduras bem como sua bioconversão. Na imagem, as setas vermelhas representam as vias mais fortemente afetadas pela presença do inibidor e as setas verdes representam aquelas que são menos afetadas. ADH: álcool desidrogenase, AIDH: aldeído desidrogenase, PDH: piruvato desidrogenase (Adaptado de Modig, Lidén e Taherzadeh, 2002) .

Tabela 5.12 - Efeito do furfural sobre os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.

Ensaio	Parâmetros Fermentativos					
	Consumo de açúcares (%)	Produção de etanol* (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	η (%)
Controle	99,7 (±0,341)	20,2 (±1,56)	0,38 (±0,011)	0,25 (±0,037)	0,84 (±0,065)	75,0 (±2,2)
12 mg.L⁻¹	100 (±0,012)	22,7 (±0,34)	0,41 (±0,003)	0,23 (±0,003)	0,76 (±0,011)	79,5 (±0,5)
20 mg.L⁻¹	99,9 (±0,066)	20,2 (±3,23)	0,44 (±0,004)	0,22 (±0,006)	0,67 (±0,108)	86,0 (±0,8)
43 mg.L⁻¹	100 (±0,011)	21,0 (±2,22)	0,40 (±0,011)	0,24 (±0,002)	0,70 (±0,074)	77,7 (±2,1)
64 mg.L⁻¹	100 (±0)	20,7 (±0,92)	0,43 (±0,003)	0,23 (±0,004)	0,86 (±0,038)	85,0 (±0,6)
84 mg.L⁻¹	99,8 (±0,127)	17,0 (±3,0)	0,41 (±0,019)	0,21 (±0,003)	0,71 (±0,125)	80,8 (±3,7)

* Valores considerando a produção máxima obtida, a qual foi em 24 horas para o controle e para concentrações iniciais maiores ou iguais a 64 mg.L⁻¹ de furfural e de 30 horas para os demais.

Nota-se ainda na Tabela 5.12 que, para todas as concentrações de furfural avaliadas, tanto o fator de conversão de substrato em células (Y_{X/S}) quanto o fator de conversão de substrato em produto (Y_{P/S}) não variaram em relação ao controle, apresentando valores médios de 0,23 e 0,42, respectivamente. Como consequência da similaridade nos valores de Y_{P/S}, a eficiência de conversão do processo na presença de diferentes concentrações de furfural situou-se em torno de 80%. Um comportamento semelhante ao observado no presente trabalho para o fator Y_{P/S} foi também mostrado por Bellido et al. (2011). Estes autores estudaram o efeito do furfural nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹ sobre a fermentação de *Pichia stipitis* a partir de xilose e glicose e obtiveram valores de Y_{P/S} semelhantes ao meio ausente de furfural (0,39 g/g) em todas as condições avaliadas.

Quanto à produção máxima de etanol nota-se que, de um modo geral, os valores obtidos nos meios adicionados de furfural foram semelhantes aos

observados no controle sem este furano. Não foram observados grandes impactos na produtividade (Q_P), cujo valor médio foi de $74 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Este mesmo comportamento não foi observado por Bellido et al. (2011), os quais relataram em seus estudos uma queda da produtividade com o aumento da concentração de furfural no meio de fermentação. Segundo estes autores, para o controle, a produtividade obtida foi de $0,68 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, enquanto na presença de 0,5, 1,0 e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural este valor caiu para 0,50, 0,34 e $0,24 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A diferença no comportamento observado por estes autores quando comparado ao presente trabalho pode ser atribuída à faixa de concentração empregada por eles, a qual é muito superior àquela avaliada neste estudo.

5.6.3. 5-hidroximetilfurfural

A avaliação do impacto da presença de 5-hidroximetilfurfural (HMF) sobre o metabolismo fermentativo da levedura *Pichia stipitis* foi feita por meio da adição deste composto ao meio de fermentação nas concentrações iniciais de 218, 331, 424, 454 e 553 mg.L^{-1} . Os perfis cinéticos referentes ao consumo de açúcares, variação de pH, produção de biomassa e produção de etanol, obtidos durante 30 horas de cultivo, estão representados nas Figuras 5.16 e 5.17.

Observa-se, na Figura 5.16A, que o consumo de açúcares não foi afetado pela presença de HMF em nenhum dos níveis avaliados. Assim como no controle sem o furano, os açúcares foram completamente consumidos após um período de 30 horas em todos os níveis de HMF avaliados. Um comportamento distinto foi observado por Liu et al. (2004), que avaliaram o efeito do HMF nas concentrações de $1,26 \text{ g.L}^{-1}$ a $15,13 \text{ g.L}^{-1}$ sobre a fermentação alcoólica por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 a partir de 23 g.L^{-1} de glicose. Os autores observaram que, na ausência de HMF, a glicose foi totalmente consumida após um período de 16 horas, enquanto que na presença de $1,36 \text{ g.L}^{-1}$ do furano ocorreu um atraso de 4 a 8 horas no início do consumo deste açúcar. Este atraso foi ainda maior, chegando a 30 e 48 horas, quando o meio continha $3,78 \text{ g.L}^{-1}$ e $7,57 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF, respectivamente. A diferença de comportamento observada no presente trabalho pode ser atribuída às concentrações iniciais de HMF empregadas, as quais foram muito inferiores àquelas avaliadas por Liu et al. (2004).

Figura 5.16 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de 5-HMF em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem HMF (—■—), 218 mg.L⁻¹ (—●—), 331 mg.L⁻¹ (—▲—), 424 mg.L⁻¹ (—▼—), 454 mg.L⁻¹ (—◆—) e 553 mg.L⁻¹ (—◆—) de HMF.

As diferenças no perfil fermentativo de leveduras, onde se inclui o consumo de açúcares, na presença de compostos com potencial inibitório, como o HMF, podem ser atribuídas não somente à concentração inicial do composto no meio de fermentação como também à utilização de diferentes espécies ou cepas de micro-organismos. Keating, Panganiban e Mansfield (2006), ao estudarem o efeito da presença de HMF sobre a fermentação de 100 g.L^{-1} glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* Tembec T1 e *Saccharomyces cerevisiae* Y-1528, observaram que, na presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF as leveduras consumiram todo o açúcar em 8 horas, um período ligeiramente superior ao observado no controle (6 h). Já na presença de 4 g.L^{-1} do furano, o tempo para o consumo de glicose foi de aproximadamente 9 horas para *S. cerevisiae* Tembec T1 e em torno de 10 horas para *S. cerevisiae* Y-1528. Ao estudarem o efeito do HMF nas concentrações iniciais de 100 e 500 mg.L^{-1} sobre a fermentação alcoólica por *Pichia stipitis* DSM 3651 em meio contendo 36 g.L^{-1} glicose e 20 g.L^{-1} de xilose como fontes de carbono, Bellido et al. (2011) relataram que o consumo de glicose não foi afetado pela presença de HMF, enquanto no maior nível testado foi observado um pequeno residual de xilose após 168 horas de fermentação, o que não foi observado no controle. Este comportamento foi diferente do observado no presente trabalho, onde a adição de 500 mg de HMF não prejudicou o consumo de xilose. Provavelmente o tipo de levedura empregado e os níveis de açúcares utilizados no presente trabalho podem ter sido responsáveis pelo comportamento observado.

O perfil cinético de mudança de pH durante a fermentação na presença de HMF está mostrado na Figura 5.16B. Nota-se que o valor de pH decresceu em todos os ensaios, porém naqueles meios em que houve adição do furano a variação foi menor (1,25 unidades) quando comparada ao controle (1,5 unidades). Esta discrepância pode ser atribuída a diferenças no metabolismo da levedura na presença de HMF, pois o micro-organismo deve apresentar um comportamento de assimilação/liberação de moléculas de caráter ácido ou básico diferente daquele que ocorre na ausência do composto.

Na Figura 5.17A está representado o perfil cinético de crescimento de *Pichia stipitis* em meio contendo glicose e xilose como fontes de carbono, na presença de HMF em concentrações iniciais entre 218 e 553 mg.L^{-1} .

Figura 5.17 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de HMF em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem HMF (—■—), 218 mg.L^{-1} (—●—), 331 mg.L^{-1} (—▲—), 424 mg.L^{-1} (—▼—), 454 mg.L^{-1} (—◆—) e 553 mg.L^{-1} (—▲—) de HMF.

Observa-se que, para todos os meios de fermentação avaliados, a quantidade de biomassa formada foi similar após 30 horas (aproximadamente 14 g.L⁻¹). Quando comparado ao controle, no qual foram obtidos 16,8 g.L⁻¹ de células, nota-se que o impacto negativo do HMF sobre o crescimento celular não é muito expressivo e que independe da concentração inicial deste composto no meio de fermentação. Liu et al. (2004) observaram um comportamento distinto sobre o crescimento de *Pichia stipitis* em meio contendo glicose como fonte de carbono. Segundo os autores, o impacto do HMF sobre o crescimento da levedura se tornou maior à medida que a concentração inicial de HMF foi aumentada. Na presença de 1,26 g.L⁻¹ do furano, os autores observaram um pequena fase *lag*, a qual foi estendida para 8 horas quando a concentração inicial deste composto foi aumentada para 3,78 g.L⁻¹. Já nas concentrações iniciais de HMF iguais ou superiores a 7,57 g.L⁻¹ não foi observado crescimento algum. Delgenes, Moletta e Navarro (1996) também relataram um comportamento distinto daquele observado no presente trabalho. Segundo os autores, ao estudarem o efeito da presença de HMF sobre a conversão de 20 g.L⁻¹ de xilose a etanol por *Pichia stipitis*, foi observado um aumento gradativo na inibição do crescimento à medida que a concentração inicial de HMF foi aumentada de 1 g.L⁻¹ para 3 e 5 g.L⁻¹. A biomassa final relativa ao controle nestas condições foi de 95, 31 e 1,4%, respectivamente. De acordo com Slininger, Gorsich e Liu (2009), a composição nutricional do meio de fermentação pode alterar a tolerância de *Pichia stipitis* à presença de HMF, utilizando-se glicose ou xilose como fontes de carbono. Em seus estudos, ao comparar a utilização de ureia ou aminoácidos como fonte de nitrogênio, os autores observaram que o fornecimento de 20 a 100% do nitrogênio na forma de aminoácidos aumentou a tolerância da levedura ao HMF e diminuiu a taxa específica de morte. Estes mesmos autores relataram ainda que este fator diminui a taxa de morte da levedura, mas não influencia a produção de furano-2,5-dimetanol. Desta forma, com base nos dados apresentados e na literatura correspondente, é possível inferir que, não somente a concentração de HMF, mas também as condições do meio de fermentação são fatores essenciais para ditar o impacto global causado presença deste composto sobre o metabolismo da levedura.

O perfil cinético de produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* a partir de glicose e xilose na presença de diferentes concentrações iniciais de HMF está

representado na Figura 5.17B. Nota-se que a adição deste furano em concentrações de até 424 mg.L^{-1} praticamente não gerou impacto negativo na produção total de etanol, a qual atingiu, em média, $19,7 \text{ g.L}^{-1}$ enquanto no controle esta produção foi de $20,2 \text{ g.L}^{-1}$. A única diferença observada foi que, na concentração inicial de 218 mg.L^{-1} , a produção máxima foi obtida após 30 horas de fermentação, um tempo superior às 24 horas necessárias para o controle atingir o máximo em etanol. Por outro lado, nos maiores níveis de HMF avaliados, foi observado um maior impacto negativo sobre a produção máxima de etanol, sendo observadas quedas de 25 e 18% em relação ao controle quando a levedura foi exposta a 454 e 553 mg.L^{-1} de HMF, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Bellido et al. (2011) ao estudarem a produção de etanol por *Pichia stipitis* em meio contendo uma mistura de 36 g.L^{-1} de glicose e 20 g.L^{-1} de xilose como fontes de carbono. Neste trabalho, a produção de etanol em meio contendo $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF foi semelhante àquela obtida no ensaio controle (em torno de $22,8 \text{ g.L}^{-1}$). Já na presença de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF, foi observada uma ligeira queda na produção de etanol, a qual atingiu em torno de 20 g.L^{-1} . Delgenes, Molleta e Navarro (1996) observaram em seus estudos de conversão de xilose a etanol por *Pichia stipitis* que a presença de 1, 3 e 5 g.L^{-1} de HMF no meio de fermentação inibe a produção de etanol pela levedura em 17, 90 e 91,4% em relação ao controle, respectivamente. Esta queda acentuada na produção quando comparada àquela observada no presente trabalho pode ser justificada pelo fato de que as concentrações de HMF empregadas pelos autores foram muito superiores àsquelas avaliadas no presente trabalho.

O perfil cinético de assimilação de HMF pela levedura *Pichia stipitis* está representado na Figura 5.18. Observa-se que, independentemente da concentração inicial do furano adicionada ao meio de fermentação, este composto foi completamente consumido nas primeiras 4 horas de processo. De fato, diversos autores observaram a assimilação deste composto por leveduras de várias espécies, como por exemplo, *Pichia stipitis* (SLININGER; GORSICH; LIU, 2009; LIU et al., 2004; DELGENES; MOLLETA; NAVARRO, 1996), *Candida shehatae*, *Zymomonas mobile* (DELGENES; MOLLETA; NAVARRO, 1996), *Saccharomyces cerevisiae* (KEATING; PANGANIBAN; MANSFIELD, 2006; LIU et al., 2004; DELGENES; MOLLETA; NAVARRO, 1996; SANCHEZ; BAUTISTA, 1988) e *Candida guilliermondii* (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988). De acordo com a

literatura, o composto furano-2,5-dimetanol é frequentemente descrito como o produto de conversão do HMF por leveduras em processos fermentativos (SLININGER; GORSICH; LIU, 2009; ALMEIDA et al., 2008; LIU et al., 2004; TAHERZADEH et al. 2000). Apesar disto, nenhum produto de biotransformação por *Pichia stipitis* foi detectado por meio das técnicas analíticas empregadas no presente trabalho.

Figura 5.18 - Cinética de consumo de HMF por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de HMF em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem HMF (—■—), 218 mg.L⁻¹ (—●—), 331 mg.L⁻¹ (—▲—), 424 mg.L⁻¹ (—▼—), 454 mg.L⁻¹ (—◆—) e 553 mg.L⁻¹ (—◆—) de HMF.

Almeida et al. (2008) identificaram, em seus estudos in vitro com *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada pela adição do gene que codifica a enzima xilose redutase (XR) de *Pichia stipitis*, que a enzima XR de *P. stipitis* tem participação na conversão de HMF a furano-2,5-dimetanol, apesar de a atividade específica da enzima ao utilizar HMF como substrato ser aproximadamente 6 vezes menor que aquela observada quando o substrato é a xilose. Os autores constataram, por meio de estudos comparativos com *S. cerevisiae* que não produzia XR e com *S. cerevisiae* geneticamente modificada

que produzia esta enzima em baixos ou em altos níveis, que quanto maiores os níveis de produção desta enzima por parte da levedura, maior é conversão do HMF no seu produto de redução. Os autores observaram ainda que a XR de *Pichia stipitis* é capaz de converter HMF em furano-2,5-dimetanol utilizando tanto NADH quanto NADPH como cofatores reduzidos, sendo que a atividade da enzima utilizando NADPH é maior quando comparada àquela utilizando-se NADH.

Modig, Lidén e Taherzadeh (2002), ao realizarem estudos *in vitro* sobre a inibição da atividade das enzimas álcool desidrogenase (ADH), aldeído desidrogenase (AIDH) e piruvato desidrogenase (PDH) pela presença de HMF em concentrações entre 1 e 4 g.L⁻¹, observaram que o efeito deste furano é muito mais pronunciado sobre PDH que sobre ADH e AIDH, pois a presença de aproximadamente 1,9 g.L⁻¹ deste composto faz com que a enzima PDH perca totalmente sua atividade, enquanto que as enzimas ADH e AIDH ainda mantêm, aproximadamente, 50 e 60% da sua atividade, respectivamente, nas mesmas condições. Esta interferência negativa na atividade enzimática por parte do HMF pode prejudicar o metabolismo de leveduras, como discutido por Keating, Panganiban e Mansfield (2006). Estes autores observaram, em estudos com *Saccharomyces cerevisiae* na presença de 3 e 4 g.L⁻¹ de HMF, que a assimilação deste furano ocorre em uma velocidade dependente da sua concentração inicial no meio de fermentação, diferentemente do observado no presente trabalho. Os mesmos autores relataram ainda que a redução do HMF pode ocorrer pela ação da enzima ADH e que, como descrito por Wahlbom e Hahn-Hägerdal (2002), o cofator preferencialmente utilizado na redução deste composto é o NADPH, um cofator reduzido útil em reações anabólicas, o que pode alterar a síntese de macromoléculas como aminoácidos e nucleotídeos pela célula de levedura. De fato, Ask et al. (2013), ao realizarem estudos com *S. cerevisiae* geneticamente modificada pela inserção de genes que codificam xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Pichia stipitis*, demonstraram que a alimentação do meio de fermentação em reator com concentrações subletais de furfural e HMF simultaneamente levou a uma redução da disponibilidade tanto de NADH quanto de NADPH no interior da célula. Os autores relataram que a queda na carga de redução anabólica provocada por este furano pode ter efeitos imprevisíveis no metabolismo celular.

A partir dos resultados apresentados anteriormente sobre o impacto causado pela presença de HMF sobre a fermentação de xilose a etanol por *Pichia stipitis*, foi feita uma avaliação dos dados de consumo de açúcares, produção máxima de etanol e formação máxima de biomassa relativos ao controle, o que permite uma melhor avaliação global do impacto do HMF sobre a levedura. Estes dados estão sumarizados numericamente na Tabela 5.13 e, graficamente, na Figura 5.19.

Nota-se, pela observação da Figura 5.19, que o consumo de açúcares não foi afetado pela presença de HMF no meio de fermentação, tendo em vista que o substrato foi totalmente consumido após 30 horas de processo tanto no controle quanto na presença do furano em todas as concentrações avaliadas.

O impacto negativo sobre a formação de biomassa foi em torno de 11%, como pode ser observado na Tabela 5.13 e na Figura 5.19. Tendo em vista que o cofator preferencial na redução de HMF a furano-2,5-dimetanol é o NADPH, uma molécula cujo poder redutor nas células está associado a reações de síntese de macromoléculas, é notável que a presença de HMF no meio de fermentação escoa parte do NADPH produzido nas células de micro-organismos fermentativos para o processo de destoxificação, o que leva a uma interferência negativa na síntese de moléculas tais como nucleotídeos e aminoácidos (WAHLBOM; HAHN-HÄGERDAL, 2002). Isto leva a uma competição no metabolismo celular, entre a conversão de HMF a um produto menos tóxico e o crescimento celular por meio da síntese de biomassa, e esta competição pode ser responsável pela menor produção de biomassa observada no presente trabalho quando a levedura foi exposta ao HMF.

Quanto ao etanol (Tabela 5.13 e Figura 5.19), nota-se que a produção deste composto foi negativamente afetada apenas nas duas maiores concentrações de HMF avaliadas no presente trabalho (454 e 553 mg.L⁻¹), sendo que nas concentrações de até 424 mg.L⁻¹ os valores relativos de produção de etanol se mantiveram próximos aos 100% atribuídos ao ensaio controle.

A partir dos resultados apresentados anteriormente, foram calculados os parâmetros fermentativos da conversão de xilose e glicose a etanol por *Pichia stipitis* na presença de diferentes concentrações iniciais de HMF avaliadas no presente trabalho. Estes parâmetros estão apresentados na Tabela 5.14.

Tabela 5.13 - Efeito do HMF sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por *Pichia stipitis*.

Concentração inicial de HMF (mg.L ⁻¹)	% Relativa ao Controle		
	Consumo de substrato	Produção máxima de etanol	Formação máxima de biomassa
0	100	100	100
218	100,2	95,4	85,4
331	100,1	98,8	91,2
424	100,1	98,6	89,4
454	99,5	75,4	92,0
553	100,2	82,4	88,7

Figura 5.19 - Efeito do HMF relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—✕—).

Tabela 5.14 - Efeito do HMF sobre os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.

Ensaio	Parâmetros Fermentativos					
	Consumo de açúcares (%)	Produção de etanol* (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	η (%)
Controle	99,7 (±0,341)	20,2 (±1,56)	0,38 (±0,011)	0,25 (±0,037)	0,84 (±0,065)	75,0 (±2,2)
218 mg.L⁻¹	99,9 (±0,094)	19,3 (±2,54)	0,39 (±0,029)	0,26 (±0,017)	0,64 (±0,085)	77,3 (±5,7)
331 mg.L⁻¹	99,9 (±0,112)	19,9 (±0,59)	0,43 (±0,009)	0,22 (±0,017)	0,83 (±0,025)	83,6 (±1,7)
424 mg.L⁻¹	99,9 (±0,131)	19,9 (±0,01)	0,43 (±0)	0,23 (±0,018)	0,83 (±0)	83,3 (±0,0)
454 mg.L⁻¹	99,3 (±0,544)	15,2 (±3,71)	0,40 (±0,023)	0,26 (±0,005)	0,51 (±0,124)	77,9 (±4,5)
553 mg.L⁻¹	99,9 (±0,109)	16,6 (±6,11)	0,29 (±0,094)	0,24 (±0,001)	0,55 (±0,204)	57,7 (±18)

* Valores considerando a produção máxima obtida, a qual foi em 24 horas para o controle e para concentrações iniciais de 331 e 424 mg.L⁻¹ de HMF e de 30 horas para os demais.

Os resultados apresentados na Tabela 5.14 com relação ao consumo de açúcares e produção de etanol reiteram aqueles observados nas Figuras 5.16A e 5.19 bem como na Tabela 5.13. Nota-se, mais uma vez, que houve completo consumo de açúcares tanto no controle quanto em todas as concentrações de HMF avaliadas no presente trabalho e que a produção de etanol sofreu impacto negativo apenas nas duas maiores concentrações de HMF avaliadas, as quais foram 454 e 553 mg.L⁻¹. Esta queda na produção de etanol afetou negativamente os valores de produtividade (Q_P), os quais foram 39 e 35% inferiores aos 0,84 g.L⁻¹.h⁻¹ obtidos para o controle sem HMF.

Quanto ao fator de conversão de substrato em células (Y_{X/S}), nota-se que se manteve semelhante àquele observado no controle em todas as concentrações de HMF avaliadas, e seu valor foi, em média, de 0,24 g/g. Tendo em vista que a quantidade de células produzida por grama de substrato na presença de HMF foi semelhante àquela observada no controle, e também que a concentração final de células na presença deste furano foi inferior àquela obtida na sua ausência, é

possível que um menor fluxo de carbono tenha sido direcionado para a produção celular na presença de HMF quando comparado ao ensaio controle sem este composto.

Observa-se ainda na Tabela 5.14 que o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) manteve-se semelhante ou ligeiramente maior que aquele observado no controle (0,39 g/g) nas concentrações de HMF de até 454 mg.L⁻¹, ou seja, a levedura sintetizou quantidades similares ao controle de etanol por grama de açúcar consumido, mesmo na presença de HMF nestas concentrações. Isto gerou valores de eficiência de conversão semelhantes ao do controle na presença de HMF em concentrações de até 454 mg.L⁻¹, em torno de 80%. Em contrapartida, no maior nível testado, que foi de 553 mg.L⁻¹ de HMF, este valor caiu de 0,39 g/g para 0,29 g/g. Esta queda no fator de conversão gerou uma diminuição de 24% na eficiência de conversão de substrato. Bellido et al. (2011) encontraram comportamento similar ao observado no presente trabalho com relação ao fator de conversão de substrato em etanol por *Pichia stipitis*. Estes autores relataram que a presença de HMF nas concentrações iniciais de 100 e 500 mg.L⁻¹ levou a fatores de conversão de 0,42 e 0,38 g/g, respectivamente, valores similares ao controle, o qual foi de 0,39 g/g, utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.

5.6.4. Vanilina

A vanilina foi testada como inibidor do metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* individualmente no meio de fermentação nas concentrações iniciais de 55, 79, 117 e 175 mg.L⁻¹. Os perfis cinéticos referentes ao consumo de açúcares, variação de pH, produção de biomassa e produção de etanol, obtidos durante 30 horas de cultivo, estão representados nas Figuras 5.20 e 5.21.

Nota-se, pela observação da Figura 5.20A, que a presença de vanilina no meio de fermentação em concentrações iniciais de até 117 mg.L⁻¹ não prejudicou o consumo de glicose e xilose pela levedura *Pichia stipitis* no presente trabalho, pois os açúcares foram totalmente consumidos após 30 horas de processo fermentativo. Por outro lado, a adição de 175 mg.L⁻¹ deste aldeído ao meio de fermentação promoveu uma ligeira queda no consumo, resultando num residual de 5,5% do açúcar inicial, o que não ocorreu nos outros ensaios. Sampaio et al.

(2007), ao realizarem estudos sobre a conversão de xilose a xilitol por *Debaryomyces hansenii*, verificaram que o consumo de 60 g.L^{-1} de xilose pela levedura foi mais lento na presença de vanilina. Os autores relataram que, na ausência de vanilina, a levedura consumiu todo o açúcar presente no meio de fermentação em 83 horas. Todavia, a presença deste fenólico nas concentrações iniciais de 0,5, 1,75 e $3,00 \text{ g.L}^{-1}$ fez com que o tempo gasto para o consumo do açúcar fosse de 70, 92 e 120 horas, respectivamente. Ou seja, assim como no presente trabalho, estes autores observaram que a presença de vanilina nas mais altas concentrações avaliadas aumentou o tempo necessário para o consumo total do substrato. Zhao et al. (2012) avaliaram o efeito da presença de vanilina sobre o metabolismo de *Rhodosporidium toruloides*, uma levedura oleaginosa, com a finalidade de aprimorar a produção de biodiesel utilizando-se materiais lignocelulósicos como fontes de carbono. Os autores observaram que, na presença de até $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina, o consumo do substrato (60 g.L^{-1} de xilose e 6 g.L^{-1} de glicose) foi semelhante àquele observado no controle sem o aldeído. Por outro lado, a adição de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina causou inibição no consumo de substrato, que praticamente não foi consumido pela levedura mesmo após 140 horas de fermentação. Segundo estes autores, a assimilação de açúcares, bem como outros parâmetros fermentativos, são negativamente afetados pela presença de vanilina devido à perda de seletividade da membrana plasmática.

Quanto ao pH durante o processo fermentativo na presença de vanilina observa-se, pela Figura 5.20B, que sua variação seguiu um perfil diferente daquele observado no ensaio controle, um comportamento similar àquele observado na presença de outros compostos avaliados anteriormente no presente trabalho. A menor queda no pH observada nos ensaios realizados na presença de vanilina quando comparada ao ensaio controle indica que a assimilação ou liberação de moléculas com caráter ácido ou básico foi alterada pela presença do composto testado. Desta forma, é possível inferir que a presença da vanilina causa alterações no metabolismo fermentativo da levedura.

Figura 5.20 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de vanilina em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem vanilina (—■—), 55 mg.L⁻¹ (—●—), 79 mg.L⁻¹ (—▲—), 117 mg.L⁻¹ (—▼—) e 175 mg.L⁻¹ (—◆—) de vanilina.

Quanto ao crescimento celular, nota-se na Figura 5.21A que este parâmetro foi prejudicado em todas as concentrações de vanilina avaliadas no presente trabalho. Além disso, observa-se que a diminuição do crescimento foi semelhante em todas as concentrações do aldeído avaliadas, pois houve uma queda média de 16% na biomassa total de *Pichia stipitis* formada após 30 horas de processo em relação ao controle, no qual foram obtidos $16,2 \text{ g.L}^{-1}$ de células. Delgenes, Molleta e Navarro (1996) também observaram inibição do crescimento de *Pichia stipitis* por vanilina utilizando xilose como fonte de carbono. No entanto, diferentemente do presente trabalho, estes autores observaram que o efeito inibitório se tornou maior com o aumento da concentração inicial do aldeído, pois a biomassa final atingida foi de 12, 0,7 e 1,4% daquela obtida no controle nas concentrações iniciais de 0,5, 1,0 e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina, respectivamente. A diferença no perfil de crescimento observado por estes autores quando comparado ao presente trabalho pode ser justificada pelo fato de que as concentrações de vanilina por eles avaliadas foram muito superiores às aquelas empregadas neste estudo e, portanto, o efeito inibitório foi muito mais pronunciado. Nishikawa, Sutcliffe e Saddler (1988) avaliaram o efeito de vários compostos fenólicos, entre eles a vanilina, sobre a fermentação de 20 g.L^{-1} de xilose a 2,3-butanodiol por *Klebsiella pneumoniae* por meio do monitoramento do crescimento da levedura bem como da produção do solvente. Os autores adicionaram a vanilina ao meio de fermentação em concentrações iniciais de 300 a 600 mg.L^{-1} , e descreveram um comportamento semelhante àquele observado no presente trabalho. Segundo estes autores, independentemente da concentração inicial do aldeído avaliada, a inibição na produção de biomassa foi de aproximadamente 9% após 48 horas de processo fermentativo.

O perfil cinético da produção de etanol por *Pichia stipitis* na presença de variadas concentrações iniciais de vanilina está apresentado na Figura 5.21B. Nota-se que a presença deste aldeído no meio de fermentação em concentrações de até 117 mg.L^{-1} não promoveu grandes alterações na concentração máxima de etanol obtida, a qual foi de 95, 98 e 90% daquela observada no controle ($20,2 \text{ g.L}^{-1}$) nas concentrações iniciais de vanilina de 55, 79 e 117 mg.L^{-1} , respectivamente. No entanto, na presença de 55 mg.L^{-1} deste fenólico, a concentração máxima de etanol foi atingida apenas após 30 horas de processo fermentativo, um comportamento distinto do controle, no qual a produção máxima foi observada

Figura 5.21 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de vanilina em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem vanilina (—■—), 55 mg.L⁻¹ (—●—), 79 mg.L⁻¹ (—▲—), 117 mg.L⁻¹ (—▼—) e 175 mg.L⁻¹ (—▼—) de vanilina.

após 24 horas de fermentação. Observando-se ainda a Figura 5.21B, nota-se que na presença de vanilina na concentração inicial de 175 mg.L^{-1} ocorreu uma queda mais expressiva na produção máxima de etanol quando comparada aos outros níveis avaliados, pois foram obtidos apenas $13,5 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol após 30 horas. Um comportamento semelhante foi observado por Tran e Chambers (1986) na conversão de xilose a etanol por *Pichia stipitis* na presença de vanilina. Os autores relataram que 910 mg.L^{-1} de vanilina no meio de fermentação, ou seja, uma concentração inicial 5 vezes superior ao maior nível avaliado no presente trabalho, reduziu em 54,3% a produção de etanol quando comparado ao controle, pois a levedura atingiu uma concentração de etanol de apenas $10,2 \text{ g.L}^{-1}$ a partir de 50 g.L^{-1} de xilose quando exposta à presença de vanilina. Similarmente, Delgenes, Molleta e Navarro (1996) observaram, em seus estudos sobre a conversão de 20 g.L^{-1} de xilose a etanol por *Pichia stipitis*, que o impacto da vanilina é dependente da concentração do inibidor, ou seja, o aumento da concentração inicial do composto aumenta o grau de inibição na produção de etanol. Segundo estes autores, a adição de 0,5, 1,0 e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina ao meio de fermentação reduziu em 89, 91 e 94% a produção de etanol, respectivamente, em relação ao controle. A vanilina adicionada ao meio de fermentação foi assimilada por *Pichia stipitis*, conforme mostrado na Figura 5.22. No menor nível de vanilina testado, que corresponde a 55 mg.L^{-1} deste composto, a assimilação total foi observada após 12 horas de fermentação, quando foram observados apenas traços do aldeído no meio. Por outro lado, nas concentrações iniciais de 79 e 117 mg.L^{-1} , a vanilina foi assimilada pela levedura apenas com 20 horas de processo, enquanto que na concentração inicial de 175 mg.L^{-1} , foi observada uma remoção completa apenas após 24 horas de fermentação. Nota-se que há uma tendência de decaimento exponencial na concentração da vanilina, o que sugere que a velocidade da assimilação do composto por *Pichia stipitis* é máxima nos momentos iniciais do cultivo e, à medida que a vanilina é assimilado e sua concentração diminui no meio de fermentação, esta velocidade é reduzida.

Delgenes, Moletta e Navarro (1996) também observaram assimilação de vanilina pela levedura *Pichia stipitis*. Segundo estes autores, a taxa de assimilação deste composto pelas leveduras fermentadoras de pentoses, incluindo *P. stipitis* e *Candida shehatae*, foi maior quando comparada às taxas alcançadas pelas leveduras fermentadoras de hexoses, tais como

Saccharomyces cerevisiae e *Zymomonas mobilis*, sendo que esta última citada não foi capaz de assimilar o aldeído, segundo os autores.

Figura 5.22 - Cinética de consumo de vanilina por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de vanilina em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 55 mg.L⁻¹ (—●—), 79 mg.L⁻¹ (—▲—), 117 mg.L⁻¹ (—▼—) e 175 mg.L⁻¹ (—◆—) de vanilina.

No presente estudo, a assimilação de vanilina pela levedura *Pichia stipitis* pode ainda ser observada ainda pelo perfil de absorção das amostras de fermentação no intervalo de comprimentos de onda entre 190 e 600 nm, apresentado na Figura 5.23. Nota-se que, pela varredura espectral, o meio contendo vanilina no tempo inicial de fermentação apresenta picos de absorção em 245 e 345 nm, os quais não são observados no controle e, portanto, podem ser atribuídos à presença da vanilina. No tempo final de fermentação, estes picos não são observados, o que indica a remoção deste composto do meio de fermentação pela levedura.

Figura 5.23 - Varredura espectral no ultravioleta dos meios de fermentação adicionados de vanilina nas concentrações iniciais de (A) 55 mg.L⁻¹, (B) 79 mg.L⁻¹, (C) 117 mg.L⁻¹ e (D) 175 mg.L⁻¹. Nas imagens, as cores representam: controle no tempo de 0 horas (—), ensaio com vanilina no tempo de 0 horas (—) e ensaio com vanilina no tempo de 30 horas (—).

Cortez e Roberto (2010a), ao estudarem o efeito inibitório da vanilina sobre a bioconversão de xilose a xilitol por *Candida guilliermondii*, relataram que esta levedura apresentou capacidade de assimilação deste aldeído, o qual foi convertido a álcool vanilil e ácido vanílico pela levedura. Segundo os autores, o produto de redução (álcool vanilil) foi formado preferencialmente, correspondendo a 94% da conversão da vanilina, enquanto que o produto de oxidação (ácido vanílico) respondeu por menos de 5%. Cortez e Roberto (2010b) observaram ainda em outro estudo com *C. guilliermondii* que este micro-organismo não consumiu o álcool vanilil produzido, visto que após a bioconversão completa da vanilina, a concentração do produto de redução permaneceu constante até o final do processo.

No presente trabalho também foram observados produtos de conversão da vanilina por *Pichia stipitis*, como é possível observar na Figura 5.24. Nota-se que a levedura converteu a vanilina em álcool vanilil (Figura 5.24A) e ácido vanílico (Figura 5.24B), sendo o produto de redução formado preferencialmente.

Buchert e Niemelä (1991) observaram que a bactéria *Gluconobacter oxydans*, cultivada em meio contendo 50 g.L⁻¹ de xilose e 2,5 g.L⁻¹ de glicose, também apresentou a capacidade de converter vanilina em ácido vanílico e álcool vanilil. No entanto, a produção de ácido vanílico atingiu fatores de conversão de 100% (p/p) a partir de vanilina, enquanto que a de álcool vanilil se restringiu a apenas um terço das concentrações de ácido correspondentes. Este comportamento foi distinto daquele observado no presente trabalho, no qual foi formado preferencialmente o produto de redução em detrimento daquele de oxidação. Segundo os autores, o sistema enzimático de *G. oxydans* responsável pela catálise oxidativa que levou à destoxificação da vanilina foi induzido pela presença do aldeído no meio de fermentação.

Similarmente ao presente trabalho, Nishikawa, Sutcliffe e Saddler (1988), ao estudarem os efeitos inibitórios da vanilina sobre a fermentação de xilose por *Klebsiella pneumoniae*, observaram que, na concentração inicial de 600 mg.L⁻¹, o aldeído foi convertido principalmente a álcool vanilil pela bactéria, o qual correspondeu a 43,5% da vanilina originalmente adicionada. Segundo os autores, foram também detectados outros produtos em mínimas concentrações, os quais consistiam de produtos de condensação modificados da vanilina que não puderam ser identificados.

Figura 5.24 - Cinética de formação de álcool vanilil (A) e ácido vanílico (B) como produtos da bioconversão da vanilina por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de vanilina em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 55 mg.L⁻¹ (—●—), 79 mg.L⁻¹ (—▲—), 117 mg.L⁻¹ (—▼—) e 175 mg.L⁻¹ (—◄—) de vanilina.

Com a finalidade de se obter uma análise global do efeito da vanilina sobre a fermentação de *Pichia stipitis*, os dados de consumo de açúcares, produção máxima de etanol e formação máxima de biomassa relativos ao controle foram sumarizados na Tabela 5.15 e na Figura 5.25. Nota-se claramente que o efeito da vanilina sobre o crescimento celular foi similar em todas as concentrações avaliadas, ou seja, houve uma redução na concentração celular em torno de 16%. Em contrapartida, o efeito sobre o consumo de açúcares não foi muito expressivo e foi observado apenas na maior concentração do aldeído avaliada. O maior impacto foi sobre a produção de etanol, o qual foi observado apenas com 175 mg.L⁻¹ de vanilina. Isto indica que a presença de baixas concentrações de vanilina individualmente no meio de fermentação não é prejudicial ao metabolismo fermentativo de *P. stipitis* nas condições avaliadas.

Ji et al. (2011), em estudos com *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, atribuíram a diminuição do crescimento e da produção de etanol à conversão da vanilina a álcool vanilil, uma vez que esta redução é catalisada por desidrogenases endógenas não-específicas, as quais utilizam NADH, um cofator necessário para a produção de etanol. Zhao et al. (2012), visando a obtenção de biodiesel empregando a levedura oleaginosa *Rhodospiridium toruloides*, observaram, assim como no presente trabalho, que o acúmulo de biomassa é prejudicado pela presença de vanilina. Segundo estes autores, compostos fenólicos em geral causam perda da integridade das membranas biológicas, o que prejudica sua funcionalidade como barreira seletiva e matriz enzimática e gera a redução no crescimento e na assimilação de substrato. Apesar de não ter se verificado efeito da vanilina sobre a assimilação de substrato, deve-se levar em conta que a atuação da vanilina como inibidor do metabolismo microbiano depende das concentrações avaliadas e do micro-organismo empregado, como evidenciado por Fitzgerald et al. (2004) em análises sobre o modo de ação antimicrobiana da vanilina em diferentes tipos de micro-organismos.

A partir dos dados apresentados anteriormente, foram calculados os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* na presença de vanilina, os quais estão sumarizados na Tabela 5.16. Nota-se que o consumo de açúcares não foi afetado pela presença de vanilina, sendo observada apenas uma discreta queda (6%) quando o meio de fermentação continha 175 mg.L⁻¹ do aldeído.

Tabela 5.15 - Efeito da vanilina sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por *Pichia stipitis*.

Concentração inicial de vanilina (mg.L ⁻¹)	% Relativa ao Controle		
	Consumo de substrato	Produção máxima de etanol	Formação máxima de biomassa
0	100	100	100
55	99,8	95,2	84,7
79	99,9	98,1	85,0
117	99,6	89,8	82,8
175	94,6	67,0	82,5

Figura 5.25 - Efeito da vanilina relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—X—).

Tabela 5.16 - Efeito da vanilina sobre os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.

Ensaio	Parâmetros Fermentativos					
	Consumo de açúcares (%)	Produção de etanol* (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	η (%)
Controle	99,7 (±0,341)	20,2 (±1,56)	0,38 (±0,011)	0,25 (±0,037)	0,84 (±0,065)	75,0 (±2,2)
55 mg.L⁻¹	99,6 (±0,421)	19,2 (±3,60)	0,34 (±0,077)	0,22 (±0,016)	0,64 (±0,120)	67,9 (±15)
79 mg.L⁻¹	99,6 (±0,390)	19,8 (±3,00)	0,38 (±0,015)	0,22 (±0,013)	0,83 (±0,124)	76,7 (±3,0)
117 mg.L⁻¹	99,4 (±0,029)	18,1 (±1,71)	0,36 (±0,002)	0,21 (±0,021)	0,76 (±0,071)	72,1 (±0,3)
175 mg.L⁻¹	94,4 (±3,531)	13,5 (±0,07)	0,29 (±0,069)	0,26 (±0,014)	0,45 (±0,002)	58,7 (±14)

* Valores considerando a produção máxima obtida, a qual foi em 24 horas para o controle e para concentrações iniciais de 79 e 117 mg.L⁻¹ de vanilina e de 30 horas para os demais.

Um comportamento semelhante foi observado para a produção de etanol, pois nota-se que a adição de até 117 mg.L⁻¹ deste composto ao meio não alterou a produção de etanol por *Pichia stipitis* quando comparada ao controle, no qual foram atingidos 20,3 g.L⁻¹ de etanol. Em contrapartida, no maior nível avaliado, foram obtidos apenas 13,5 g.L⁻¹ de produto. Esta mesma tendência foi observada para o fator de conversão de substrato em produto (Y_{P/S}), sendo obtidos valores semelhantes ao controle (0,39 g/g) para concentrações de vanilina de até 117 mg.L⁻¹. Acima desta concentração, especificamente com 175 mg.L⁻¹, o valor de Y_{P/S} decresceu para 0,29 g/g. Esta queda no fator de conversão pode explicar a redução observada na produção de etanol final, pois indica que, para cada grama de substrato consumido, foi produzido 0,29 g de etanol, um valor inferior a 0,39 g observado no controle. Como consequência da redução no Y_{P/S}, observa-se que a eficiência de conversão (η) na presença de 175 mg.L⁻¹ de vanilina atingiu apenas 59%, um valor muito inferior aos 75% observados no controle.

Em estudos conduzidos com a levedura *Debaryomyces hansenii* visando a produção de xilitol, Sampaio et al. (2007) observaram que Y_{P/S} foi reduzido em

concentrações de vanilina de até 3,0 g.L⁻¹. Segundo os autores, este valor decresceu de 0,74 g/g para 0,56 g/g na presença de 1,75 g.L⁻¹ de vanilina. Por outro lado, Cortez e Roberto (2010b) não observaram alteração do fator de conversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* na presença de 2,0 g.L⁻¹ de vanilina em comparação ao controle.

Quanto ao fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), nota-se que este valor manteve-se próximo àquele obtido no ensaio controle (0,24 g/g) em todas as concentrações de vanilina avaliadas (Tabela 5.16). Um comportamento semelhante foi observado por Sampaio et al. (2007) durante o cultivo de *Debaryomyces hansenii* em meio contendo xilose como fonte de carbono adicionado de 0,5, 1,75 e 3,0 g.L⁻¹ de vanilina, nos quais foram observados valores de $Y_{X/S}$ de aproximadamente 0,1 g/g para todos os meios avaliados.

Quanto à produtividade volumétrica (Q_P), observa-se que o impacto negativo foi expressivo apenas na maior concentração de vanilina avaliada, a qual foi de 175 mg.L⁻¹. Sampaio et al. (2007) também relataram quedas nos valores de Q_P utilizando a levedura *Debaryomyces hansenii* para produção de xilitol e, segundo os autores, esta queda chegou a 61% em relação ao controle quando a concentração inicial de vanilina no meio foi de 3,0 g.L⁻¹. Em contrapartida, Cortez e Roberto (2010b) não observaram redução significativa nos valores de produtividade volumétrica em xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* em meios contendo 2,0 g.L⁻¹ de.

A partir dos dados experimentais do presente trabalho bem como dos dados da literatura, nota-se que o efeito inibitório da vanilina depende não somente da sua concentração inicial no meio, como também do micro-organismo empregado no processo fermentativo, visto que o grau de inibição em concentrações similares é variável em tipos diferentes de leveduras.

5.6.5. Siringaldeído

Para avaliar o efeito do siringaldeído sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis*, foram realizados ensaios na presença deste composto nas concentrações iniciais de 90, 170, 302, 466 e 620 mg.L⁻¹. Os perfis cinéticos referentes ao consumo de açúcares, variação de pH, produção de biomassa e produção de

etanol, obtidos durante 30 horas de cultivo, estão representados nas Figuras 5.26 e 5.27.

Conforme mostrado na Figura 5.26A, a presença de siringaldeído em todos os níveis avaliados afetou o consumo de açúcares pela levedura *Pichia stipitis*, uma vez que, após 30 horas de fermentação, apenas no ensaio controle não foi observada concentração residual de açúcar. Nota-se ainda que o efeito inibitório deste fenólico se tornou maior com o aumento de sua concentração inicial no meio de fermentação. No menor nível de siringaldeído avaliado (90 g.L^{-1}), a concentração residual de xilose após 30 horas foi de $2,2 \text{ g.L}^{-1}$, sendo esta aumentada para $35,8 \text{ g.L}^{-1}$ quando a concentração do siringaldeído foi aumentada em aproximadamente 6 vezes (620 mg.L^{-1}). Desta forma, conclui-se que o siringaldeído apresenta um efeito bastante expressivo sobre o consumo de substrato por *Pichia stipitis*, principalmente em concentrações acima de 466 mg.L^{-1} , nas quais o consumo está por volta de 45% em relação ao controle. Diferentemente do comportamento observado no presente trabalho, Pereira, Mussatto e Roberto (2011) não observaram inibição no consumo de xilose por *Candida guilliermondii* na presença de siringaldeído em concentrações de até 800 mg.L^{-1} . Em contrapartida, Hu et al. (2009) relataram que o siringaldeído foi capaz de afetar negativamente o consumo de glicose pela levedura oleaginosa *Rhodospiridium toruloides*, ainda que, segundo os autores, tenha sido uma inibição branda, uma vez que na presença de $2,18 \text{ g.L}^{-1}$ deste composto o consumo de substrato correspondeu a 87,6% daquele observado no controle.

Com relação à variação de pH durante o processo fermentativo na presença de diferentes concentrações iniciais de siringaldeído (Figura 5.26B), nota-se que, no ensaio controle, a queda de pH foi de aproximadamente 1,5 unidades, enquanto que a presença de siringaldeído tornou esta variação muito menos expressiva. Observa-se ainda que, quanto maior a concentração de siringaldeído no meio de fermentação, menor foi a queda no pH ao final do processo, de tal maneira que no maior nível avaliado praticamente não se observa variação no pH. Mais uma vez, esta diferença de comportamento do pH em relação ao controle pode ser atribuída a mudanças no metabolismo da levedura, a qual deixa de ter um padrão normal de liberação ou assimilação de

Figura 5.26 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de siringaldeído em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem siringaldeído (—■—), 90 mg.L⁻¹ (—●—), 170 mg.L⁻¹ (—▲—), 302 mg.L⁻¹ (—▼—) e 466 mg.L⁻¹ (—◆—) e 620 mg.L⁻¹ (—◇—) de siringaldeído.

moléculas de caráter ácido ou básico para se adaptar a presença da molécula inibidora no meio de fermentação.

A Figura 5.27A mostra o perfil do crescimento celular de *Pichia stipitis* em meio contendo diferentes concentrações de siringaldeído. Nota-se que a presença de 90 mg.L⁻¹ de siringaldeído no meio de fermentação causou uma pequena diminuição na biomassa final formada, que atingiu 14,7 g.L⁻¹, quando comparada ao controle (16,2 g.L⁻¹). Com o aumento da concentração deste composto para 302 mg.L⁻¹, além de uma fase *lag* de aproximadamente 4 horas no crescimento do micro-organismo, a biomassa total formada foi reduzida para 6,9 g.L⁻¹ de células. No maior nível avaliado, este impacto é ainda mais expressivo, sendo observada uma fase *lag* superior a 8 horas e apenas 3,7 g.L⁻¹ de biomassa, o que correspondeu a apenas 22% do controle. Delgenes, Molleta e Navarro (1996) encontraram comportamentos semelhantes em relação ao presente trabalho quanto à formação de biomassa por leveduras fermentadoras de xilose na presença de siringaldeído. Segundo estes autores, a levedura *Pichia stipitis* apresentou crescimento de 72, 38 e 3,6% em relação ao controle na presença de 200, 750 e 1500 mg.L⁻¹ de siringaldeído, respectivamente, enquanto que o crescimento da levedura *Candida shehatae* foi de 89, 45 e 5% em relação ao controle na presença das mesmas concentrações de siringaldeído citadas anteriormente, respectivamente. Este resultado mostra que leveduras diferentes podem responder de maneiras diferentes a concentrações similares do inibidor, visto que a intensidade da inibição sobre o crescimento não foi a mesma. Nishikawa, Sutcliffe e Saddler (1988) avaliaram o efeito de vários compostos fenólicos, entre eles o siringaldeído, sobre o crescimento e produção de 2,3-butanodiol a partir de xilose por *Klebsiella pneumoniae*. Segundo os autores, 200 mg.L⁻¹ do composto foi o suficiente para diminuir em 10% o crescimento da bactéria em relação ao controle nas primeiras 24 horas de processo e, após 48 horas, essa redução foi ampliada para 18%. Kelly et al. (2008) avaliaram o efeito da exposição da levedura *Candida guilliermondii* ao siringaldeído em concentrações que variaram entre 500 e 2000 mg.L⁻¹. Segundo estes autores, quanto maior a concentração inicial do composto inibidor, maior o impacto negativo sobre o crescimento da levedura, sendo que, no maior nível avaliado, o crescimento foi de aproximadamente 10% em relação ao controle e foi observado aumento da fase *lag* de crescimento.

Figura 5.27 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de siringaldeído em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem siringaldeído (—■—), 90 mg.L^{-1} (—●—), 170 mg.L^{-1} (—▲—), 302 mg.L^{-1} (—▼—) e 466 mg.L^{-1} (—◆—) e 620 mg.L^{-1} (—▲—) de siringaldeído.

A produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* também foi afetada negativamente pela presença de siringaldeído no meio de fermentação, como mostrado na Figura 5.27B. Semelhante ao comportamento observado para o consumo de substrato e para a produção de biomassa, a grandeza do impacto deste composto sobre a produção de etanol está diretamente relacionada ao aumento de sua concentração no meio de fermentação. Nota-se que a produção de etanol tornou-se mais lenta quando a levedura foi exposta ao siringaldeído, a ponto de não haver produção significativa de produto nas 8 primeiras horas de fermentação nos dois maiores níveis do inibidor avaliados. A produção máxima no controle ($20,2 \text{ g.L}^{-1}$) foi alcançada com 24 horas, enquanto que a presença de siringaldeído nos cinco níveis avaliados, em ordem crescente, resultou em produções máximas de $13,5 \text{ g.L}^{-1}$, $12,1 \text{ g.L}^{-1}$, $6,8 \text{ g.L}^{-1}$, $5,3 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,5 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, após 30 horas. Desta forma, a presença de 170 mg.L^{-1} de siringaldeído reduziu a produção de etanol em 40% no presente trabalho, enquanto que Delgenes, Moletta e Navarro (1996) observaram que a presença de 200 mg.L^{-1} de este composto no meio de fermentação diminuiu a produção de etanol a partir de xilose por *Pichia stipitis* em 39% e Tran e Chambers (1986) relataram que 220 mg.L^{-1} de siringaldeído resultaram em uma queda de 72% na produção de etanol utilizando a mesma levedura. Pela observação destes dados, conclui-se que o grau de inibição na produção de etanol causado pela presença do siringaldeído no meio de fermentação depende não somente da sua concentração ou do micro-organismo avaliado, mas também das condições de cultivo empregadas, tendo em vista que um mesmo micro-organismo, neste caso *Pichia stipitis*, exposta a concentrações similares de siringaldeído apresentou diferentes níveis de inibição.

O perfil de assimilação de siringaldeído pela levedura *Pichia stipitis* está mostrado na Figura 5.28. Observa-se que, para todas as concentrações de siringaldeído avaliadas, a assimilação deste composto foi apenas parcial. Nota-se ainda, pela Figura 5.29, uma clara tendência de aumento da concentração deste composto assimilada com o aumento da concentração inicial de siringaldeído adicionada ao meio de fermentação. No entanto, observa-se também que, com o aumento da concentração inicial do inibidor, a capacidade de assimilação relativa diminuiu, ou seja, quanto maior a concentração inicial de siringaldeído, maior foi a

Figura 5.28 - Cinética de consumo de siringaldeído por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de siringaldeído em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 90 mg.L⁻¹ (●), 170 mg.L⁻¹ (▲), 302 mg.L⁻¹ (▼) e 466 mg.L⁻¹ (◆) e 620 mg.L⁻¹ (▲) de siringaldeído.

Figura 5.29 - Perfil de assimilação de siringaldeído por *Pichia stipitis* em função de concentração inicial deste composto no meio de fermentação. As cores representam: concentração de siringaldeído assimilado (—■—) e porcentagem do siringaldeído inicial assimilado (—*—).

concentração residual deste fenólico ao final do processo. Isto mostra que a levedura apresenta capacidade limitada de destoxificação deste composto nas condições avaliadas, o que consequentemente afetou os parâmetros do processo, especialmente o crescimento e a produção de etanol.

Buchert e Niemelä (1991), empregando a bactéria *Gluconobacter oxydans*, observaram um comportamento semelhante ao do presente trabalho pois, segundo os autores, a bactéria assimilou apenas parcialmente o siringaldeído quando foi exposta a 2 g.L^{-1} deste composto.

A assimilação do siringaldeído pela levedura *Pichia stipitis* foi também acompanhada pela varredura espectral em UV, conforme mostrado na Figura 5.30. Nota-se a existência de picos de absorção nos comprimentos de onda de 250 nm e 365 nm que não foram observados para o controle, podendo, portanto, ser atribuídos à presença do siringaldeído no meio de fermentação. Após 30 horas de processo, observa-se uma redução destes picos, a qual pode ser atribuída à assimilação do composto pela levedura. A redução na altura do pico a 365nm foi proporcional à redução observada nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência, pois nas menores concentrações de siringaldeído foi observada maior redução do pico (aproximadamente 70%), enquanto na maior concentração houve a menor redução (33%). Nota-se ainda um ligeiro aumento de absorção a 275 nm, o qual pode ser devido à formação de produtos de degradação do siringaldeído.

Durante a assimilação do siringaldeído pela levedura *Pichia stipitis*, foi detectada a formação de produtos metabólicos, identificados por análises cromatográficas. Foi constatada a formação do produto de oxidação do siringaldeído, o ácido sirínico, em baixas concentrações ($<15 \text{ mg.L}^{-1}$) em relação ao siringaldeído consumido, o que pode significar que a via oxidativa não foi a preferencial para a degradação do inibidor pela levedura *Pichia stipitis*. Cortez e Roberto (2010b) também observaram assimilação apenas parcial de siringaldeído do meio de fermentação pela levedura *Candida guilliermondii* e, mesmo havendo assimilação de 80% dos $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de siringaldeído adicionados, foram observadas apenas pequenas concentrações do produto de conversão, o ácido sirínico ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$). Os autores sugeriram que isto pode ser atribuído à conversão do composto em outros produtos, como o álcool siringil que, assim como no presente trabalho, não foi analisado por eles.

Figura 5.30 - Varredura espectral no ultravioleta dos meios de fermentação adicionados de siríngaldeído nas concentrações iniciais de (A) 90 mg.L⁻¹, (B) 170 mg.L⁻¹, (C) 302 mg.L⁻¹, (D) 466 mg.L⁻¹ e (E) 620 mg.L⁻¹. Nas imagens, as cores representam: controle no tempo de 0 horas (—), ensaio com siríngaldeído no tempo de 0 horas (—) e ensaio com siríngaldeído no tempo de 30 horas (—).

Nishikawa, Sutcliffe e Saddler (1988), empregando *Klebsiella pneumoniae*, e Buchert e Niemelä (1991), empregando *Gluconobacter oxydans*, observaram bioconversão de siringaldeído a álcool siringil em baixas concentrações por estas bactérias. Ainda segundo Nishikawa, Sutcliffe e Saddler (1988), não foi possível a determinação de um produto de degradação majoritário pois, além do álcool siringil, os autores identificaram a formação de trimetoxibenzeno e uma grande parte de compostos de maior massa molar sintetizados por condensação e que sofreram modificações posteriores tais como metilações e reduções, os quais não puderam ser devidamente identificados.

Além da presença de ácido siríngico, o cromatograma da Figura 5.31 mostra outro pico presente no meio de fermentação adicionado de siringaldeído. Este pico foi observado na região próxima ao álcool vanilil, o que sugere que possa corresponder ao álcool siringil. Devido à falta de padrão, este composto não foi devidamente identificado. Não é possível fazer inferências sobre as concentrações deste composto no meio e cultura, pois, mesmo havendo uma correlação linear entre a área do pico no cromatograma e sua concentração na amostra em análise, esta concentração depende ainda de um fator de resposta do detector, que varia conforme a substância analisada.

Figura 5.31 - Perfil cromatográfico obtido pela análise de amostras de meio de fermentação adicionados de siringaldeído, onde são observados produtos metabólicos como o ácido siríngico e um produto não-identificado (NI), o qual poderia corresponder ao álcool siringil.

Com base nos dados apresentados anteriormente e a fim de realizar-se uma avaliação global do impacto do siringaldeído sobre a fermentabilidade de *Pichia stipitis*, os dados de consumo de açúcares, produção máxima de etanol e formação máxima de biomassa foram sumarizados na Tabela 5.17 bem como na Figura 5.32 na forma de valores relativos ao controle.

Observando-se a Figura 5.32 pode-se concluir que o efeito do siringaldeído foi mais pronunciado sobre a produção de etanol do que sobre o crescimento celular ou consumo de açúcares, apesar destes parâmetros terem sido fortemente afetados pela presença deste composto no meio de fermentação em todas as concentrações avaliadas. Este comportamento também foi notado por Delgenes, Moletta e Navarro (1996), os quais relatam que a produção de etanol é mais afetada do que o crescimento.

Segundo Kelly et al. (2008), os compostos inibitórios podem afetar o crescimento celular aumentando a fase *lag* de crescimento, que corresponde a uma fase de adaptação da levedura à presença da molécula no meio, e estes compostos podem também alterar ou diminuir a taxa de crescimento. No presente trabalho, foi observado um crescimento mais lento, com aumento da fase *lag* e diminuição da biomassa total formada, em decorrência da exposição da levedura a concentrações crescentes de siringaldeído.

A influência de diversos compostos inibitórios, incluindo o siringaldeído, é dependente não apenas da sua concentração no meio de fermentação e de fatores ambientais, como pH, temperatura e condições de cultivo, como também do tipo de micro-organismo utilizado. Ao contrário do observado no presente trabalho, no qual tanto o consumo de substrato quanto a conversão de biomassa ou produção de etanol foram negativamente afetadas em um alto grau utilizando-se a levedura *Pichia stipitis*, Pereira, Mussatto e Roberto (2011) observaram que para *Candida guilliermondii* apenas o crescimento foi afetado pela presença de siringaldeído em concentrações de até 800 mg.L⁻¹. Os autores ressaltaram ainda a importância de se conhecer os mecanismos inibitórios dos compostos tóxicos presentes em hidrolisados, pois são estes estudos que levarão à melhora nos resultados de bioconversão da biomassa em produtos de interesse alcançados até o momento.

Tabela 5.17 - Efeito do siringaldeído sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por *Pichia stipitis*.

Concentração inicial de siringaldeído (mg.L ⁻¹)	% Relativa ao Controle		
	Consumo de substrato	Produção máxima de etanol	Formação máxima de biomassa
90	100	100	100
170	96,4	66,8	91,0
302	80,5	60,1	69,7
466	57,6	33,7	42,7
530	46,2	26,2	33,0

Figura 5.32 - Efeito do siringaldeído relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—×—).

A partir dos dados apresentados anteriormente, foram calculados os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* na presença de siringaldeído, os quais estão sumarizados na Tabela 5.18. A análise destes parâmetros revela que a presença de siringaldeído no meio de fermentação afeta principalmente as velocidades do processo fermentativo. Isto é notado por meio da análise das produtividades (Q_P), que apresentaram quedas de 46 e 90% no menor e no maior nível avaliado, respectivamente. Uma grande queda na produtividade foi também observada por Cortez e Roberto (2010b) empregando a levedura *Candida guilliermondii* na produção de xilitol. Segundo os autores, a presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ deste composto no meio de fermentação resultou em queda de $0,60 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para $0,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no valor de Q_P . De acordo com estes resultados, nota-se que quanto maior a concentração de siringaldeído no meio de fermentação, maior foi o impacto nas produtividades, o que dificulta a viabilidade do processo.

Tabela 5.18 - Efeito do siringaldeído sobre os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.

Ensaio	Parâmetros Fermentativos					
	Consumo de açúcares (%)	Produção de etanol* (g.L^{-1})	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Q_P ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	η (%)
Controle	99,7 ($\pm 0,341$)	20,2 ($\pm 1,56$)	0,38 ($\pm 0,011$)	0,25 ($\pm 0,037$)	0,84 ($\pm 0,065$)	75,0 ($\pm 2,2$)
90 mg.L^{-1}	96,2 ($\pm 0,917$)	13,5 ($\pm 3,14$)	0,26 ($\pm 0,039$)	0,25 ($\pm 0,002$)	0,45 ($\pm 0,105$)	51,2 ($\pm 7,6$)
170 mg.L^{-1}	80,3 ($\pm 4,425$)	12,1 ($\pm 0,92$)	0,26 ($\pm 0,025$)	0,24 ($\pm 0,018$)	0,40 ($\pm 0,031$)	50,0 ($\pm 4,9$)
302 mg.L^{-1}	57,5 ($\pm 3,443$)	6,8 ($\pm 0,66$)	0,36 ($\pm 0,181$)	0,20 ($\pm 0,023$)	0,23 ($\pm 0,022$)	70,3 (± 35)
466 mg.L^{-1}	46,1 ($\pm 3,574$)	5,3 ($\pm 0,25$)	0,21 ($\pm 0,029$)	0,19 ($\pm 0,019$)	0,18 ($\pm 0,008$)	41,0 ($\pm 5,7$)
530 mg.L^{-1}	34,7 ($\pm 12,036$)	2,5 ($\pm 0,26$)	0,25 ($\pm 0,023$)	0,17 ($\pm 0,040$)	0,08 ($\pm 0,041$)	48,8 ($\pm 4,4$)

* Valores considerando a produção máxima obtida, a qual foi em 24 horas para o controle e em 30 horas para os demais.

O fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) apresentou uma queda média de 30% na presença de siringaldeído, o que consequentemente levou a baixos valores de eficiência de conversão (η), os quais se situaram em torno de 50%. Pereira, Mussatto e Roberto (2011) não encontraram o mesmo comportamento para *Candida guilliermondii* ao avaliarem a conversão de xilose a xilitol por esta levedura na presença de siringaldeído em concentrações de até 800 mg.L⁻¹. Já Cortez e Roberto (2010b), utilizando a mesma levedura, relataram que a presença de 2,0 g.L⁻¹ de siringaldeído resultou em uma queda de 42% no valor de $Y_{P/S}$ quando comparado ao controle sem o inibidor. A análise dos dados do presente trabalho, quando comparados com aqueles obtidos na literatura, leva a crer que o impacto do siringaldeído sobre os parâmetros fermentativos é dependente não somente de sua concentração no meio de fermentação como também do tipo de micro-organismo empregado, visto que *C. guilliermondii* e *Pichia stipitis* tem respostas diferentes à presença deste composto no meio de fermentação.

Quanto ao fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), nota-se, na Tabela 5.18, que seu valor diminuiu gradativamente com o aumento da concentração inicial de siringaldeído no meio de fermentação. Isto indica que a presença deste composto interfere na capacidade da levedura de converter cada grama de glicose e xilose em células. Para o controle, o $Y_{X/S}$ observado foi de 0,24 g/g, enquanto que no maior nível de siringaldeído avaliado foi observada uma queda de 29% em relação a este valor. Pereira, Mussatto e Roberto (2011) também observaram impacto no valor de $Y_{X/S}$ para o crescimento de *Candida guilliermondii* em xilose. Segundo os autores, este parâmetro caiu de 0,09 g/g para 0,06 g/g na presença de 800 mg.L⁻¹ de siringaldeído, o que representa uma queda de 33%.

5.6.6. Ácido ferúlico

Para avaliar o efeito do ácido ferúlico sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis*, este composto foi adicionado ao meio de fermentação nas concentrações iniciais de 105, 183, 290, 567 e 802 mg.L⁻¹. Os perfis cinéticos referentes ao consumo de açúcares, variação de pH, produção de biomassa e de

etanol, obtidos durante 30 horas de cultivo, estão representados nas Figuras 5.33 e 5.34.

A Figura 5.33A mostra o perfil de consumo de açúcares pela levedura na presença de diferentes concentrações de ácido ferúlico. Nota-se que, nos maiores níveis avaliados (567 e 802 mg.L⁻¹), os açúcares foram parcialmente assimilados pela levedura, apresentando consumo total de 81 e 64% de substrato, respectivamente. Quanto às demais concentrações de ácido ferúlico avaliadas, não foi observado qualquer efeito sobre o consumo de açúcares, o qual foi completo após 30 horas de fermentação. Comportamento semelhante foi observado por Pereira, Mussatto e Roberto (2011), ao estudarem o efeito do ácido ferúlico em concentrações de até 600 mg.L⁻¹ sobre a fermentação de xilose a xilitol por *Candida guilliermondii*.

A variação do pH durante o processo fermentativo está representada na Figura 5.33B. Nota-se que, em todos os ensaios fermentativos, os valores de pH decresceram com o tempo. Porém, verifica-se uma queda mais acentuada no meio ausente do ácido ferúlico (1,53 unidades de pH) quando comparada aos meios adicionadas deste composto (0,68 a 0,99 unidades de pH). Houve uma queda nestes valores, a qual esteve entre 0,68 e 0,99 unidades de pH, mas que esta não foi tão acentuada quanto aquela observada no ensaio ausente de ácido ferúlico, a qual atingiu 1,53 unidades de pH. Isto é um indicativo de que o ácido *p*-cumárico promove alterações no metabolismo da levedura, alterando seu padrão de liberação e assimilação de moléculas de caráter ácido ou básico, a fim de se adaptar à presença do composto possivelmente tóxico no meio de fermentação.

O crescimento da levedura *Pichia stipitis* na presença de diferentes concentrações iniciais de ácido ferúlico pode ser verificado na Figura 5.34A. Nota-se que este composto causou impacto negativo sobre o crescimento da levedura, cujo grau foi diretamente relacionado à concentração inicial do composto no meio de fermentação. Todos os níveis do inibidor avaliados resultaram em uma diminuição na concentração final de células quando comparados ao controle após 30 horas de fermentação. A redução da massa total de células em relação ao controle foi de 26% quando a concentração inicial de ácido ferúlico foi de 105 mg.L⁻¹ e aumentou gradativamente até atingir 66% quando a concentração do ácido foi de 802 mg.L⁻¹.

Figura 5.33 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido ferúlico em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem ácido ferúlico (—■—), 105 mg.L⁻¹ (—●—), 183 mg.L⁻¹ (—▲—), 290 mg.L⁻¹ (—▼—), 567 mg.L⁻¹ (—◆—) e 802 mg.L⁻¹ (—►—) de ácido ferúlico.

Figura 5.34 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido ferúlico em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem ácido ferúlico (—■—), 105 mg.L⁻¹ (—●—), 183 mg.L⁻¹ (—▲—), 290 mg.L⁻¹ (—▼—), 567 mg.L⁻¹ (—◆—) e 802 mg.L⁻¹ (—▲—) de ácido ferúlico.

Um comportamento semelhante ao observado no presente trabalho também foi relatado por Pereira, Mussatto e Roberto (2011) para o crescimento da levedura *Candida guilliermondii*. Os autores adicionaram ácido ferúlico ao meio de fermentação em concentrações de até 600 mg.L⁻¹, e notaram que o aumento da biomassa foi afetado negativamente em todas as concentrações testadas, sendo que no maior nível avaliado foi observada uma redução de 30% na massa de células total formada. Harris et al. (2010), com o objetivo de melhorar a qualidade de vinhos, estudaram o efeito antimicrobiano do ácido ferúlico sobre leveduras do gênero *Dekkera* isoladas de bebidas, pois estas leveduras normalmente são encontradas como contaminantes de vinho, e observaram que este composto prejudicou o crescimento destes micro-organismos. Estes autores avaliaram o efeito da presença de ácido ferúlico em concentrações que variaram entre 49 mg.L⁻¹ e 388 mg.L⁻¹ sobre o crescimento de *D. anomala* e *D. bruxellensis*, e concluíram que este composto, além de aumentar a fase *lag*, impediu o crescimento destas leveduras no maior nível testado. Com base nos resultados, os autores sugerem a utilização deste composto em concentrações inibitórias para o contaminante visando o controle de qualidade da bebida.

A produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* na presença de diferentes concentrações iniciais de ácido ferúlico pode ser observada na Figura 5.34B. Nota-se que a adição deste composto nas concentrações de 105, 183 e 290 mg.L⁻¹ não afetou a produção de etanol, a qual atingiu valores máximos de em torno de 20 g.L⁻¹ após 24 horas, valores estes que foram similares aos atingidos no ensaio controle após o mesmo tempo de fermentação. Por outro lado, quando a concentração inicial do ácido ferúlico foi elevada para 567 e 802 mg.L⁻¹ a produção máxima de etanol decresceu para 13,2 g.L⁻¹ e 14,3 g.L⁻¹, após 24 e 30 horas, respectivamente. Estes resultados revelam que existe um limiar de concentração de ácido ferúlico, situado entre 290 e 567 mg.L⁻¹, o qual se torna tóxico para a produção de etanol por *P. stipitis* nas condições avaliadas. De fato, Larsson et al. (2000), ao estudarem o efeito do ácido ferúlico sobre a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de glicose, relataram impacto negativo do composto sobre este parâmetro em altas concentrações. Estes autores suplementaram o meio de fermentação contendo 20 g.L⁻¹ de substrato com 20, 200 e 1000 mg.L⁻¹ de ácido ferúlico e obtiveram valores de concentração de etanol de 5,44 g.L⁻¹, 2,48 g.L⁻¹ e 1,12 g.L⁻¹ em 8 horas. Tais resultados

demonstram que, acima de 200 mg.L⁻¹ de ácido ferúlico, a capacidade fermentativa da levedura foi fortemente afetada, uma vez que a produção de etanol foi reduzida em 54 e 79% nos dois maiores níveis, respectivamente.

O acompanhamento da concentração do ácido ferúlico durante a fermentação de xilose a etanol por *Pichia stipitis* está representado na Figura 5.35. Observa-se que a levedura não foi capaz de assimilar o ácido ferúlico em nenhuma das concentrações avaliadas até 24 horas. Após este período, observa-se uma discreta redução na concentração deste composto. Vale ressaltar que, nas condições de análise empregadas no presente trabalho, não foram detectados produtos de degradação provenientes do ácido ferúlico em nenhuma das condições testadas.

Figura 5.35 - Cinética de consumo de ácido ferúlico por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido ferúlico em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 105 mg.L⁻¹ (●), 183 mg.L⁻¹ (▲), 290 mg.L⁻¹ (▼), 567 mg.L⁻¹ (◆) e 802 mg.L⁻¹ (◆) de ácido ferúlico.

A assimilação do ácido ferúlico foi também monitorada por meio da varredura espectral em UV, a qual está representada pela Figura 5.36. Nota-se a existência de um pico de absorção em 250nm devido à presença de ácido ferúlico no meio de fermentação, pois este pico não foi observado no controle. Após 30 horas de processo, verifica-se uma redução discreta na absorbância nas regiões de comprimentos de onda inferiores a 400nm, que pode ser atribuída à assimilação do ácido ferúlico pela levedura *Pichia stipitis*. Tais resultados corroboram com aqueles previamente discutidos com base nas análises cromatográficas.

Ainda que *Pichia stipitis* não seja capaz de assimilar o ácido ferúlico e convertê-lo em produtos de degradação menos tóxicos, existem relatos na literatura de outros micro-organismos que são capazes de assimilar este ácido, e esta capacidade pode ter importância industrial e econômica. Um exemplo é a descarboxilação do ácido ferúlico para formação de seu derivado vinilfenólico, que pode ser ainda metabolizado a um derivado etilfenólico, o 4-etilguaiaacol, por leveduras do gênero *Dekkera*, as quais são consideradas contaminantes em vinhos devido a estas reações (HARRIS et al. 2010). O excesso destes derivados voláteis (etilfenólico e vinilfenólico) pode trazer características organolépticas desagradáveis e, portanto, indesejáveis à bebida, o que torna a biotransformação do ácido ferúlico um fator a ser evitado.

Ainda acerca da indústria de alimentos, Knockaert et al. (2012) verificaram que bactérias lácticas são capazes de transformar o ácido ferúlico em produtos de degradação como ácido hidroferúlico, 4-vinilguaiaacol, 4-etilguaiaacol e vanilina. De acordo com estes autores, o ácido ferúlico está presente na forma livre em alimentos processados por fermentação, por esterilização ou congelamento, e pode ser convertido por bactérias presentes nos alimentos, o que não é desejável, pois as características originais dos alimentos são alteradas. Estes autores concluíram que as conversões são dependentes não somente do tipo de micro-organismo empregado e da sua fase de crescimento, como também das concentrações de ácido ferúlico presentes no meio.

Figura 5.36 - Varredura espectral no ultravioleta dos meios de fermentação adicionados de ácido ferúlico nas concentrações iniciais de (A) 105 mg.L⁻¹, (B) 183 mg.L⁻¹, (C) 290 mg.L⁻¹, (D) 567 mg.L⁻¹ e (E) 802 mg.L⁻¹. Nas imagens, as cores representam: controle no tempo de 0 horas (—), ensaio com ácido ferúlico no tempo de 0 horas (—) e ensaio com ácido ferúlico no tempo de 30 horas (—).

Com a finalidade de avaliar-se o impacto causado pela presença do ácido ferúlico sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* de uma maneira abrangente e comparativa, os dados referentes consumo de açúcares, produção máxima de etanol e à formação máxima de biomassa foram reunidos na Tabela 5.19 relativos ao controle, bem como na Figura 5.37. Com base na análise destas informações, conclui-se que o maior impacto causado pelo ácido ferúlico é sobre o crescimento de *P. stipitis*, o qual incide sobre todos os níveis avaliados e, mesmo no menor nível, é observada uma queda de 26% na biomassa em relação ao controle. O impacto se estende para os parâmetros de consumo do substrato e produção do etanol, sobretudo em concentrações a partir de 567 mg.L⁻¹.

Comportamento semelhante ao observado no presente trabalho foi verificado por Larsson et al. (2000), os quais encontraram em seus estudos com *Saccharomyces cerevisiae* que a presença de ácido ferúlico foi mais prejudicial ao crescimento celular do que à conversão de glicose a etanol na faixa de concentração de 20 a 1000 mg.L⁻¹. Pereira, Mussatto e Roberto (2011), estudando a conversão de xilose a xilitol por *Candida guilliermondii*, também constataram que o efeito inibitório do ácido ferúlico incidiu primariamente sobre o crescimento da levedura e menos fortemente sobre a formação do produto.

Harris et al. (2010) avaliaram o efeito do ácido ferúlico sobre o crescimento de leveduras do gênero *Dekkera* e também reportaram que este composto prejudicou o crescimento dos micro-organismos. Estes autores realizaram estudos sobre o impacto do ácido ferúlico na morfologia destas leveduras, e constataram que a exposição das mesmas a concentrações mínimas inibitórias de ácido ferúlico foi suficiente para inibir o crescimento, apesar de não ser fungicidas, pois mesmo havendo alterações morfológicas ainda foram observados brotamentos. As alterações observadas foram enrugamento e deformidade celular, em um grau dependente da levedura avaliada bem como da concentração do inibidor. Além disto, os brotamentos também eram deformados. Segundo os autores, isto sugere que as modificações nas células de *Dekkera* induzidas pela presença de ácido ferúlico afetam tanto a membrana celular quanto o crescimento vegetativo, mas ainda assim são necessários mais estudos para elucidar o mecanismo pelo qual este composto de fato afeta as células.

Tabela 5.19 - Efeito do ácido ferúlico sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por *Pichia stipitis*.

Concentração inicial de ácido ferúlico (mg.L ⁻¹)	% Relativa ao Controle		
	Consumo de substrato	Produção máxima de etanol	Formação máxima de biomassa
0	100	100	100
105	99,9	103,0	74,5
183	99,1	112,7	63,4
290	96,9	93,8	56,4
567	81,2	65,6	42,3
802	62,4	71,1	33,7

Figura 5.37 - Efeito do ácido ferúlico relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—✕—).

Com base nos dados apresentados anteriormente, foram calculados os parâmetros fermentativos para a conversão de xilose e glicose a etanol por *Pichia stipitis* na presença de diferentes concentrações iniciais de ácido ferúlico. Estes dados estão sumarizados na Tabela 5.20. Conforme discutido anteriormente, tanto o consumo de açúcares quanto a produção de etanol foram afetados apenas nos dois maiores níveis de ácido ferúlico avaliados, cujas quedas atingiram em média 19 e 38%, respectivamente, para o consumo de açúcares e em média 32% para a produção de etanol.

Tabela 5.20 - Efeito do ácido ferúlico sobre os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.

Ensaio	Parâmetros Fermentativos					
	Consumo de açúcares (%)	Produção de etanol* (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	η (%)
Controle	99,7 (±0,341)	20,2 (±1,56)	0,38 (±0,011)	0,25 (±0,037)	0,84 (±0,065)	75,0 (±2,2)
105 mg.L⁻¹	99,6 (±0,171)	20,8 (±0,86)	0,42 (±0,035)	0,19 (±0,003)	0,87 (±0,036)	81,5 (±6,8)
183 mg.L⁻¹	98,8 (±0,529)	22,7 (±1,25)	0,43 (±0,022)	0,20 (±0,026)	0,76 (±0,042)	84,8 (±4,4)
290 mg.L⁻¹	96,6 (±1,213)	18,9 (±0,28)	0,42 (±0,011)	0,14 (±0,009)	0,79 (±0,012)	82,7 (±2,1)
567 mg.L⁻¹	81,0 (±4,366)	13,2 (±0,07)	0,35 (±0,008)	0,14 (±0,024)	0,55 (±0,003)	69,1 (±1,7)
802 mg.L⁻¹	62,2 (±2,166)	14,4 (±0,37)	0,43 (±0,017)	0,14 (±0,009)	0,48 (±0,012)	84,5 (±3,3)

* Valores considerando a produção máxima obtida, a qual foi em 24 horas para o controle e para concentrações iniciais de 105, 290 e 567 mg.L⁻¹ de ácido ferúlico e de 30 horas para os demais.

Observa-se ainda na Tabela 5.20 que, na presença de ácido ferúlico em concentrações de até 290 mg.L⁻¹, os valores de produtividade volumétrica em etanol (Q_P) foram similares ao do controle (aproximadamente 0,8 g.L⁻¹.h⁻¹). Porém, em concentrações de ácido ferúlico acima deste valor, os valores de Q_P foram reduzido para em torno de 0,5 g.L⁻¹.h⁻¹. De fato, Larsson et al. (2000)

observaram um comportamento semelhante com relação à produtividade volumétrica em etanol em fermentações de *Saccharomyces cerevisiae* empregando glicose como fonte de carbono. Segundo estes autores, a presença de 20 mg.L⁻¹ de ácido ferúlico não causou alterações no valor de Q_P , o qual se manteve em torno de 0,67 g.L⁻¹.h⁻¹, enquanto que o aumento da concentração deste composto para 200 e 1000 mg.L⁻¹ resultou na queda do valor de Q_P para 0,31 e 0,14 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente. Pereira, Mussatto e Roberto (2011), ao estudarem a conversão de xilose a xilitol por *Candida guilliermondii*, relataram que a adição de 200, 400 e 600 mg.L⁻¹ de ácido ferúlico no meio de fermentação resultou em quedas de, respectivamente, 14, 20 e 18% na produtividade em relação aos 0,87 g.L⁻¹.h⁻¹ obtidos no controle.

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho com relação à produção de etanol e à produtividade, pode-se inferir que, nas condições avaliadas, a ação do ácido ferúlico individualmente como inibidor depende de sua concentração no meio de fermentação, sugerindo que sua remoção completa pode não ser necessária em processos fermentativos.

Com relação aos fatores de conversão, observa-se na Tabela 5.21 que o fator referente às células ($Y_{X/S}$) foi mais afetado que o fator relativo ao produto ($Y_{P/S}$). O $Y_{X/S}$ sofreu uma queda expressiva de 0,24 g/g para em média 0,16 g/g, enquanto o $Y_{P/S}$ sofreu um discreto aumento de 0,39 g/g para em média 0,41 g/g. Como consequência, a eficiência de fermentação (η) se manteve semelhante para todos os níveis avaliados (aproximadamente 80%). Um comportamento semelhante foi observado por Larsson et al. (2000) durante a fermentação de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. Estes autores relataram que a presença de 20, 200 e 1000 mg.L⁻¹ de ácido ferúlico resultou em valores de $Y_{P/S}$ de 0,405, 0,412 e 0,407 g/g respectivamente, enquanto que para o controle este valor foi de 0,405 g/g. Quanto ao $Y_{X/S}$, estes autores encontraram valores de 0,072, 0,063 e 0,008 g/g respectivamente, enquanto que o valor obtido para o controle foi de 0,076 g/g.

5.6.7. Ácido *p*-cumárico

O efeito do ácido *p*-cumárico sobre o metabolismo fermentativo da levedura *Pichia stipitis* foi avaliado pela adição deste composto ao meio de fermentação

nas concentrações iniciais de 45, 140, 233, 319 e 426 mg.L⁻¹. Os perfis cinéticos referentes ao consumo de açúcares, variação de pH, produção de biomassa e etanol estão representados nas Figuras 5.38 e 5.39.

Nota-se, na Figura 5.38A, que a presença do ácido *p*-cumárico praticamente não causou impacto negativo sobre o consumo de açúcares, a não ser por um pequeno residual de 7% no maior nível de *p*-cumárico avaliado. Nos demais níveis, ou seja, nas concentrações de até 319 g.L⁻¹ de ácido *p*-cumárico, a levedura consumiu totalmente os açúcares.

Quanto à variação do pH, representada na Figura 5.38B, nota-se que, semelhante ao observado para fenólicos e furanos, a queda no valor de pH foi menos acentuada nos ensaios que continham o ácido *p*-cumárico quando comparado com o controle. Este comportamento é um indicativo de que o ácido *p*-cumárico promove alterações no metabolismo da levedura, alterando seu padrão de liberação e assimilação de moléculas de caráter ácido ou básico a fim de se adaptar à presença do composto possivelmente tóxico no meio de fermentação.

Com relação ao crescimento celular de *Pichia stipitis* na presença de diferentes concentrações iniciais de ácido *p*-cumárico (Figura 5.39A), nota-se que o aumento da concentração do inibidor no meio de fermentação promoveu um decréscimo na produção de biomassa. No menor nível de ácido *p*-cumárico avaliado (45 mg.L⁻¹), a redução foi de 20% na biomassa total formada em relação ao controle, o qual atingiu 16,2 g.L⁻¹ de células em 30 horas de processo fermentativo. O aumento da concentração inicial deste composto para 423 mg.L⁻¹ resultou em uma redução de 39% na biomassa total formada ao final do processo. El Modafar e el Boustani (2001) avaliaram o efeito do ácido *p*-cumárico sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* a fim de correlacionar a resistência de determinados cultivares de palmeira ao ataque deste fungo com o teor de ácido *p*-cumárico na parede celular destes cultivares. Os autores relataram que a presença de 82 mg.L⁻¹ do ácido inibiu por volta de 10 % o crescimento micelial de *F. oxysporum*, enquanto que o aumento desta concentração para 492 mg.L⁻¹ resultou em uma queda superior a 50% no crescimento. Larsson et al. (2000), ao estudarem o efeito do ácido *p*-cumárico sobre a conversão de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, relataram que a exposição da levedura a 1 g.L⁻¹ do composto resultou em uma queda na velocidade específica máxima de crescimento de 0,11 h⁻¹ para 0,07 h⁻¹.

Figura 5.38 - Cinética de consumo de açúcares (A) e variação do pH (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido *p*-cumárico em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem ácido *p*-cumárico (—■—), 45 mg.L⁻¹ (—●—), 150 mg.L⁻¹ (—▲—), 233 mg.L⁻¹ (—▼—), 319 mg.L⁻¹ (—◆—) e 423 mg.L⁻¹ (—◆—) de ácido *p*-cumárico.

Figura 5.39 - Cinética de formação de biomassa (A) e produção de etanol (B) por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido *p*-cumárico em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: controle sem ácido *p*-cumárico (—■—), 45 mg.L⁻¹ (—●—), 150 mg.L⁻¹ (—▲—), 233 mg.L⁻¹ (—▼—), 319 mg.L⁻¹ (—◀—) e 423 mg.L⁻¹ (—▶—) de ácido *p*-cumárico.

Harris et al. (2010), realizaram estudos sobre inibição do crescimento de leveduras do gênero *Dekkera* por ácidos *p*-hidroxicinâmicos, entre eles o ácido *p*-cumárico. Estes autores determinaram a concentração mínima inibitória na qual a adição do ácido não permitiu um crescimento detectável das leveduras. Segundo os autores, este valor foi de 1,64 g.L⁻¹ para *D. anomala* e 1,31 g.L⁻¹ para *D. bruxellensis*. Estes resultados demonstram que o impacto do ácido *p*-cumárico é variável entre diferentes micro-organismos.

O efeito do ácido *p*-cumárico sobre a produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* está mostrado na Figura 5.39B. Nota-se que a produção máxima de etanol no ensaio controle atingiu um valor de 20,2 g.L⁻¹ após 24 horas, e que apenas nas maiores concentrações de ácido *p*-cumárico testados ocorreu uma redução nos níveis de produto formado. Larsson et al. (2000) encontraram um comportamento similar ao observado no presente trabalho durante a fermentação de glicose por *Saccharomyces cerevisiae* em níveis de ácido *p*-cumárico semelhantes aos analisados no presente estudo. Segundo os autores, na presença de 20 e 200 mg.L⁻¹ deste composto, a produção de etanol foi de 5,6 e 5,4 g.L⁻¹, respectivamente, sendo estes valores similares ao obtido para o controle (5,4 g.L⁻¹). Entretanto, com o aumento da concentração do ácido para 1 g.L⁻¹, a produção de etanol decresceu para 3,36 g.L⁻¹, sugerindo que em maiores concentrações este composto apresenta maior toxicidade ao metabolismo da levedura.

O acompanhamento da concentração do ácido *p*-cumárico durante o processo fermentativo foi realizado e esta cinética está representada na Figura 5.40. Observa-se que a levedura *Pichia stipitis* não apresentou capacidade de assimilação deste composto no meio de fermentação e, conseqüentemente, não foram detectados produtos de sua degradação. Nota-se ainda que, nos maiores níveis avaliados, foram observadas pequenas variações na concentração do ácido *p*-cumárico, o que não permite uma análise conclusiva de que o ácido foi metabolizado pela levedura. Uma possível explicação para estas variações foi dada por Salameh et al. (2008), em estudos sobre a estabilidade e a análise da molécula de ácido *p*-cumárico em fermentações de vinho. Segundo estes autores, o ácido *p*-cumárico sofre uma reação de esterificação com o etanol, detectada por ressonância magnética nuclear e espectroscopia no infravermelho. O produto formado não foi identificado especificamente, no entanto os autores afirmaram

que a reação ocorre, apesar de ser em uma extensão limitada. Os mesmos autores relataram ainda adsorção parcial de ácido *p*-cumárico na superfície da levedura *Brettanomyces* sp., mais um fator que indica a extensão de possibilidades para justificar a variação mínima na concentração de ácido *p*-cumárico observada no presente trabalho.

Além da cromatografia líquida de alta eficiência, também foi realizada a varredura espectral em UV, em uma faixa de comprimentos de onda entre 190 e 600nm, a qual está representada na Figura 5.39. Esta metodologia corrobora com os resultados obtidos na cromatografia, os quais indicam que a levedura não foi capaz de assimilar o ácido *p*-cumárico do meio de fermentação, visto que o pico de absorção correspondente a este composto, por volta de 330 nm, praticamente não sofreu alterações do início do processo (0h) até o fim do processo fermentativo (30h).

Figura 5.40 - Cinética de consumo de ácido *p*-cumárico por *Pichia stipitis* em meio de fermentação contendo xilose e glicose como fontes de carbono e em presença de ácido *p*-cumárico em diferentes concentrações iniciais. As cores representam: 45 mg.L⁻¹ (●), 150 mg.L⁻¹ (▲), 233 mg.L⁻¹ (▼), 319 mg.L⁻¹ (◆) e 423 mg.L⁻¹ (▲) de ácido *p*-cumárico.

Figura 5.41 - Varredura espectral no ultravioleta dos meios de fermentação adicionados de ácido *p*-cumárico nas concentrações iniciais de (A) 45 mg.L⁻¹, (B) 150 mg.L⁻¹, (C) 233 mg.L⁻¹, (D) 319 mg.L⁻¹, (E) 423 mg.L⁻¹. Nas imagens, as cores representam: controle no tempo de 0 horas (—), ensaio com ácido *p*-cumárico no tempo de 0 horas (—) e ensaio com ácido *p*-cumárico no tempo de 30 horas (—).

Com a finalidade de avaliar-se o impacto causado pela presença do ácido *p*-cumárico sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* de uma maneira abrangente e comparativa, os dados referentes ao consumo de açúcares, à produção máxima de etanol e à formação máxima de biomassa foram apresentados na Tabela 5.21 relativos ao controle, bem como na Figura 5.42.

Nota-se claramente que o principal efeito do ácido *p*-cumárico foi sobre o crescimento da levedura *Pichia stipitis* para todos os níveis avaliados. De fato, no maior nível de ácido *p*-cumárico, o crescimento foi reduzido em 40% com relação ao controle, enquanto que para o consumo de substrato e produção de etanol, os valores de redução relativos ao controle não passam de 6% e 26%, respectivamente.

O efeito de ácidos *p*-hidroxicinâmicos, entre eles o ácido *p*-cumárico, sobre o crescimento de *Fusarium oxysporum* em diferentes cultivares de palma foi estudado por el Modafar e el Boustani (2001). Os autores constataram que a resistência de determinados cultivares ao fungo estava relacionada aos ácidos *p*-hidroxicinâmicos, uma vez que a concentração destes ácidos presente em cultivares resistentes era maior que aquela detectada nos susceptíveis ao ataque do fungo. Esta constatação está de acordo com os resultados do presente estudo, nos quais o impacto negativo do ácido *p*-cumárico sobre o crescimento de *Pichia stipitis* aumenta à medida que a concentração do ácido é elevada. Ainda de acordo com el Modafar e el Boustani (2001), os ácidos *p*-hidroxicinâmicos atuam inibindo tanto o crescimento micelial do fungo quanto a produção e a atividade de enzimas degradadoras da parede celular, sendo esta inibição relacionada ao grau de lipofilicidade do composto, o que irá determinar sua capacidade de penetração nas células fúngicas.

Com base nos dados apresentados anteriormente, foram calculados os parâmetros fermentativos para a conversão de misturas de glicose e xilose em etanol por *Pichia stipitis* na presença de diferentes concentrações iniciais de ácido *p*-cumárico. Os valores então obtidos estão apresentados na Tabela 5.22.

Tabela 5.21 - Efeito do ácido *p*-cumárico sobre o consumo de substrato, produção máxima de etanol e formação de biomassa por *Pichia stipitis*.

Concentração inicial de ácido <i>p</i> -cumárico (mg.L ⁻¹)	% Relativa ao Controle		
	Consumo de substrato	Produção máxima de etanol	Formação máxima de biomassa
0	100	100	100
45	100,2	98,9	79,6
150	99,6	94,8	74,1
233	99,9	89,3	68,1
319	98,1	74,3	64,8
423	93,6	86,3	61,3

Figura 5.42 - Efeito do ácido *p*-cumárico relativo ao controle sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono. As cores representam, em dados relativos ao controle: consumo de açúcares (—★—), formação de biomassa (—◆—), produção máxima de etanol (—✕—).

Tabela 5.22 - Efeito do ácido *p*-cumárico sobre os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* em meio semissintético utilizando glicose e xilose como fontes de carbono.

Ensaio	Parâmetros Fermentativos					
	Consumo de açúcares (%)	Produção de etanol* (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	η (%)
Controle	99,7 (±0,341)	20,2 (±1,56)	0,38 (±0,011)	0,25 (±0,037)	0,84 (±0,065)	75,0 (±2,2)
45 mg.L⁻¹	99,9 (±0,004)	20,0 (±1,51)	0,41 (±0,015)	0,19 (±0,045)	0,83 (±0,064)	80,1 (±3,0)
150 mg.L⁻¹	99,3 (±0,576)	19,1 (±0,97)	0,38 (±0,016)	0,17 (±0,022)	0,78 (±0,041)	74,5 (±3,2)
233 mg.L⁻¹	99,7 (±0,214)	18,0 (±0,95)	0,45 (±0,015)	0,15 (±0,032)	0,90 (±0,048)	89,0 (±3,0)
319 mg.L⁻¹	97,9 (±1,858)	15,0 (±1,44)	0,24 (±0,069)	0,14 (±0,026)	0,63 (±0,060)	47,9 (±13)
423 mg.L⁻¹	93,3 (±4,968)	17,4 (±4,73)	0,27 (±0,029)	0,14 (±0,028)	0,58 (±0,158)	53,0 (±5,4)

* Valores considerando a produção máxima obtida, a qual foi em 24 horas para o controle e para concentrações iniciais de 45, 150 e 319 mg.L⁻¹ de ácido *p*-cumárico, 20 horas para a concentração de 233 mg.L⁻¹ e de 30 horas para a concentração de 423 mg.L⁻¹.

Conforme discutido anteriormente nas Figuras 5.38A e 5.39B, tanto o consumo de açúcares quanto a produção de etanol não foram fortemente afetados pela presença de ácido *p*-cumárico no meio nas concentrações de 45 a 233 mg.L⁻¹. Porém, tendo em vista o impacto na produção de etanol nos dois maiores níveis, bem como o maior tempo para sua máxima produção, houve uma queda média de 28% nos valores de produtividade volumétrica em etanol (Q_P) quando o meio continha 319 mg.L⁻¹ e 423 mg.L⁻¹ de ácido *p*-cumárico. Larsson et al. (2000) observaram um comportamento semelhante para a produção de etanol a partir de glicose por *Saccharomyces cerevisiae* pois, segundo os autores, na ausência de ácido *p*-cumárico a levedura apresentou um valor de Q_P de 0,67 g.L⁻¹.h⁻¹, e este valor não foi alterado quando o meio continha até 200 mg.L⁻¹ deste

ácido. No entanto, o aumento da concentração inicial de ácido *p*-cumárico para 1000 mg.L⁻¹ resultou na queda de Q_P para 0,42 g.L⁻¹.h⁻¹.

Quanto ao fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), observa-se que a presença de ácido *p*-cumárico no meio de fermentação em concentrações de até 233 mg.L⁻¹ manteve este valor próximo ao do controle, o qual foi de 0,39 g/g, ou até mesmo um pouco superior. No entanto, em concentrações a partir de 319 mg.L⁻¹, este ácido promoveu uma redução no valor de $Y_{P/S}$, o qual esteve em torno de 0,25 g/g. Como consequência dos valores de $Y_{P/S}$, a eficiência de conversão (η) sofreu os maiores impactos nos dois maiores níveis avaliados no presente estudo. Este comportamento está em concordância com os valores observados para produção de etanol e com as produtividades, pois os maiores prejuízos decorrentes da presença do ácido *p*-cumárico foram observados nos dois maiores níveis avaliados, ou seja, aqueles que apresentaram os menores valores para os fatores de conversão de substrato em produto.

Ainda na Tabela 5.22, nota-se que o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) não variou acentuadamente na presença de ácido *p*-cumárico (0,14 a 1,19 g/g), entretanto, quando comparado com o controle sem este inibidor, este valor foi reduzido em aproximadamente 37%. Isto é um indicativo que a levedura teve dificuldades em converter cada grama de açúcar consumido em massa celular, o que visivelmente prejudicou seu crescimento, como pôde ser constatado anteriormente nas Figuras 5.37A e 5.39. Larsson et al. (2000) também relataram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentou sua conversão de substrato em células prejudicada pela presença do ácido *p*-cumárico.

5.7. Fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de bagaço de malte por *Pichia stipitis*

Esta etapa do estudo teve como objetivo avaliar o perfil fermentativo de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e de bagaço de malte, sem qualquer tratamento de destoxificação. Para efeito de comparação, foram ainda realizados ensaios em meio semissintético mimetizando a composição química dos hidrolisados tanto no que se refere aos açúcares quanto aos compostos inibidores previamente determinados em cada hidrolisado. Além do acompanhamento do crescimento celular, consumo de açúcares e produção

de etanol, foi também monitorada a cinética de assimilação dos principais compostos inibitórios ao metabolismo celular.

5.7.1. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz

A Figura 5.43 mostra o perfil fermentativo de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtido por hidrólise ácida, contendo 51 g.L⁻¹ de xilose, 8,5 g.L⁻¹ de glicose e 10,6 g.L⁻¹ de arabinose. Nota-se que a levedura não foi capaz de consumir a arabinose presente no hidrolisado, uma vez que a concentração deste açúcar permaneceu aproximadamente constante durante o processo fermentativo. Verifica-se ainda que a glicose foi totalmente consumida após 12 horas e que, somente após este período, a levedura iniciou o consumo da xilose. A assimilação sequencial destes açúcares por *P. stipitis* já foi reportada na literatura (NIGAM, 2002). Este comportamento, segundo Jeffries et al. (2007), pode ser atribuído ao fato de que os genes para assimilação da xilose não são expressos na presença de glicose. Além destes fatores genéticos, Kilian e van Uden (1988) constataram que a glicose e a xilose competem por transportadores para o interior da célula em mecanismos de simporte com prótons. Para o transportador de baixa afinidade, o qual é partilhado por ambos os açúcares, a inibição do transporte de xilose é competitiva na presença de glicose, e para o transportador de alta afinidade, o qual transporta apenas xilose, a inibição é do tipo não competitiva pela presença de glicose, pois os dois açúcares não competem pelo mesmo transportador, mas sim pelos prótons disponíveis no meio.

Com relação à produção de etanol (Figura 5.43), observa-se que a concentração máxima (21,8 g.L⁻¹) foi obtida em 48 horas de fermentação, e que neste tempo a levedura consumiu cerca de 90% da xilose. Quanto ao crescimento celular, observa-se uma fase *lag* nas primeiras 6 horas do processo, possivelmente devido às substâncias tóxicas presentes no hidrolisado. A máxima concentração de biomassa (8,6 g.L⁻¹) foi alcançada após 60 h de fermentação.

O perfil de assimilação de compostos inibitórios durante a fermentação em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz pela levedura *Pichia stipitis* está representado na Figura 5.44. Quanto a estes inibidores, a composição do hidrolisado foi de 1,3 g.L⁻¹ de ácido acético, 49 g.L⁻¹ de furfural, 252 g.L⁻¹ de HMF, 44 g.L⁻¹ de vanilina, 389 g.L⁻¹ de ácido ferúlico e 161 g.L⁻¹ de ácido *p*-cumárico.

Figura 5.43 - Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose, produção de etanol e crescimento celular de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. As cores representam: glicose (—*), xilose (—◇), arabinose (—●), etanol (—□) e células (—●).

Figura 5.44 - Cinética de assimilação de compostos ácidos fracos, furanos e fenólicos de baixa massa molar por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. As cores representam: ácido acético (—◇), furfural (—▲), 5-HMF (—▲), vanilina (—●), ácido ferúlico (—X) e ácido p-cumárico (—□).

Com relação ao ácido acético, nota-se que o perfil assimilação deste ácido no hidrolisado pela levedura foi linear, apresentando uma taxa de $0,035 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Quando comparado aos resultados apresentados no item 5.6.1, no qual se observou uma taxa de assimilação de $0,05 \text{ g.L.h}^{-1}$ independentemente da concentração inicial do ácido no meio semissintético, este valor decresceu em 30%. Estes dados sugerem que a presença de outros compostos inibidores no meio influencia negativamente a capacidade da levedura em metabolizar o ácido acético. Ainda com relação ao ácido acético, observa-se na Figura 5.44 que, após sua completa assimilação em 36 horas de processo fermentativo, a levedura começou a produzir este ácido. Uma hipótese para explicar este comportamento é o desvio da rota metabólica a partir do acetaldeído, ou seja, a levedura, ao invés de reduzir este composto a etanol, oxidou-o a ácido acético com concomitante redução do cofator NAD^+ . Provavelmente, a célula neste meio complexo foi submetida a algum tipo de *stress* oxidativo, o que gerou a necessidade de produção de ácido acético para regeneração de NADH em concentrações consideráveis, não observadas em outras situações no presente estudo.

Quanto aos furanos, nota-se na Figura 5.44 que tanto o HMF quanto o furfural foram completamente assimilados por *Pichia stipitis*, porém o tempo de assimilação do furfural foi de 6 horas enquanto que, para o HMF, foram necessárias 12 horas para seu total esgotamento do meio. De fato, a assimilação de furanos por *Pichia stipitis* em hidrolisados hemicelulósicos já havia sido relatada por diversos autores. Segundo Díaz et al. (2009), a levedura foi capaz de metabolizar aproximadamente 400 mg.L^{-1} de furfural em 24 horas de processo fermentativo em hidrolisado hemicelulósico de poda de oliva. Da mesma forma, Tran e Chambers (1986) relataram assimilação completa de 610 mg.L^{-1} de furfural pela levedura em hidrolisado hemicelulósico de carvalho vermelho.

Com relação aos compostos fenólicos de baixa massa molar, nota-se na Figura 5.44 que a vanilina, presente na concentração de apenas 44 g.L^{-1} , foi completamente assimilada nas 6 primeiras horas de fermentação. Por outro lado, o ácido ferúlico, na concentração de 389 mg.L^{-1} , foi apenas parcialmente metabolizado, enquanto que o ácido *p*-cumárico, cuja concentração foi de 161 mg.L^{-1} , não foi assimilado durante o processo.

A Figura 5.45 mostra o perfil fermentativo de *Pichia stipitis* em meio sintético com composição química semelhante àquela do hidrolisado

hemicelulósico de palha de arroz, não somente no que se refere ao teor de açúcares como também às concentrações dos seis principais compostos com potencial inibitório avaliados individualmente no presente trabalho. Neste ensaio, também foi realizado o monitoramento das concentrações dos compostos inibidores, e a cinética de sua assimilação está representada na Figura 5.46. A composição completa deste meio foi de 48,6 g.L⁻¹ de xilose, 8,7 g.L⁻¹ de glicose, 11,3 g.L⁻¹ de arabinose, 1,4 g.L⁻¹ de ácido acético, 35,4 g.L⁻¹ de furfural, 282,4 g.L⁻¹ de HMF, 42,2 g.L⁻¹ de vanilina, 338,2 g.L⁻¹ de ácido ferúlico e 160,0 g.L⁻¹ de ácido *p*-cumárico.

Nota-se na Figura 5.45 que, similar ao observado no hidrolisado de palha, o consumo de açúcares ocorreu de maneira sequencial, ou seja, a glicose foi consumida completamente nas 12 primeiras horas de processo, enquanto que o consumo de xilose foi iniciado somente após o esgotamento da glicose no meio. Este comportamento foi discutido anteriormente e é justificado devido a fatores genéticos e de mecanismos de transporte dos açúcares para o interior das células (JEFFRIES et al., 2007; KILIAN; VAN UDEN, 1988). O consumo total da xilose foi observado após 48 horas de processo fermentativo, um tempo inferior àquele observado para o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (60 horas). A produção de etanol atingiu 22,3 g.L⁻¹ em 48 horas de processo fermentativo, um valor comparável àquele obtido no hidrolisado de palha. Já a produção de biomassa neste meio semissintético foi superior em 69%, quando comparada ao hidrolisado de palha, pois atingiu 14,5 g.L⁻¹. Estes resultados sugerem que o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz utilizado no presente trabalho pode conter outras substâncias inibitórias ao metabolismo microbiano, as quais não foram avaliadas neste estudo.

Quanto aos compostos inibidores, observa-se na Figura 5.46 que o perfil de consumo do ácido acético pela levedura no meio semissintético foi similar ao observado no hidrolisado de palha, ou seja, o ácido foi assimilado linearmente, porém com uma taxa 1,4 vezes superior à obtida no hidrolisado. Isto é um indicativo de que, além dos compostos inibidores avaliados no presente trabalho, é possível que haja outras substâncias tóxicas no hidrolisado que afetam o metabolismo da levedura. Ainda na Figura 5.46, nota-se que, diferentemente do observado na fermentação do hidrolisado, após a completa assimilação deste ácido não foi observada sua formação.

Figura 5.45 - Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose, produção de etanol e crescimento celular de *Pichia stipitis* em meio sintético com composição química semelhante à do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. As cores representam: glicose (—x—), xilose (—◇—), arabinose (—●—), etanol (—■—) e células (—●—).

Figura 5.46 - Cinética de assimilação de compostos ácidos fracos, furanos e fenólicos de baixa massa molar por *Pichia stipitis* em meio sintético com composição química semelhante à do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. As cores representam: ácido acético (—◇—), furfural (—★—), HMF (—▲—), vanilina (—●—), ácido ferúlico (—x—) e ácido p-cumárico (—■—).

O comportamento de assimilação de compostos furanos e fenólicos por *Pichia stipitis*, mostrado na Figura 5.46, demonstra que tanto os furanos (furfural e HMF) quanto a vanilina foram completamente assimilados após 6 horas. Assim como o observado no hidrolisado de palha, o ácido ferúlico foi pobremente assimilado, enquanto que o ácido *p*-cumárico não foi assimilado por *P. stipitis*. Vale ressaltar que estes perfis de assimilação em meio semissintético estão de acordo com aqueles observados nos ensaios referentes ao efeito individual de cada inibidor.

Com base nos resultados apresentados, é possível inferir que os compostos inibidores avaliados apresentam efeito principal sobre o tempo de consumo de açúcares, de crescimento e de produção de etanol pela levedura, retardando estes parâmetros. Também nota-se que, apesar de o hidrolisado de palha de arroz e o meio sintético mimetizando este hidrolisado terem composição química semelhante, é provável que os fatores interferentes do metabolismo microbiano vão além daqueles avaliados no presente estudo, principalmente em função da complexidade química dos hidrolisados de biomassa vegetal. Isto fica evidenciado devido ao fato de os perfis fermentativos observados para o hidrolisado de palha e para o meio semissintético quimicamente semelhante ao hidrolisado exibirem diferenças entre si, principalmente com relação ao tempo para consumo de açúcares e ao crescimento celular.

5.7.2. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte

A Figura 5.47 mostra o perfil fermentativo de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte obtido por hidrólise ácida, contendo 47 g.L⁻¹ de xilose, 5,6 g.L⁻¹ de glicose e 23 g.L⁻¹ de arabinose. Observa-se que a levedura *Pichia stipitis* não consumiu a arabinose presente no hidrolisado, visto que a concentração deste açúcar permaneceu aproximadamente constante durante as 60 horas de processo fermentativo. Verifica-se ainda que a glicose foi totalmente consumida após 12 horas de fermentação e, somente após este tempo, iniciou-se o consumo de xilose pela levedura. Assim, conclui-se que o consumo destes dois açúcares não ocorre simultaneamente, mas sim de maneira sequencial.

Figura 5.47 - Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose, produção de etanol e crescimento celular de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. As cores representam: glicose (—x—), xilose (—◇—), arabinose (—●—), etanol (—■—) e células (—●—).

Figura 5.48 - Cinética de assimilação de compostos ácidos fracos, furanos e fenólicos de baixa massa molar por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. As cores representam: ácido acético (—◇—), furfural (—★—), HMF (—▲—), vanilina (—●—), ácido ferúlico (—x—) e ácido *p*-cumárico (—■—).

A justificativa para tal fato foi discutida anteriormente para o hidrolisado de palha de arroz baseada em expressão gênica e transporte de açúcares para o interior da célula (JEFFRIES et al., 2007; KILIAN; VAN UDEN, 1988) e também se aplica para o hidrolisado de bagaço de malte. O consumo total da xilose foi verificado em 60 horas de processo fermentativo.

Com relação à produção de etanol (Figura 5.47), nota-se que a concentração máxima ($21,7 \text{ g.L}^{-1}$) foi alcançada em 48 horas de processo fermentativo, e que neste período a levedura havia consumido cerca de 87% da xilose. Quanto ao crescimento celular, observa-se que a máxima concentração de biomassa ($10,6 \text{ g.L}^{-1}$) foi atingida após 60 horas.

O perfil de assimilação de compostos inibitórios durante a fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte pela levedura *Pichia stipitis* está representado na Figura 5.48. Quanto a estes inibidores, a composição do hidrolisado foi de $1,9 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético, 136 g.L^{-1} de furfural, 82 g.L^{-1} de HMF, 16 g.L^{-1} de vanilina, 86 g.L^{-1} de ácido ferúlico e 57 g.L^{-1} de ácido *p*-cumárico.

Com relação ao ácido acético, nota-se que o perfil assimilação deste ácido no hidrolisado pela levedura foi linear, apresentando uma taxa de $0,04 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Quando comparado aos resultados apresentados no item 5.6.1, no qual se observou uma taxa de assimilação de $0,05 \text{ g.L.h}^{-1}$ independentemente da concentração inicial do ácido no meio semissintético, este valor decresceu em 20%. Estes dados sugerem que a presença de outros compostos inibidores no meio influencia negativamente a capacidade da levedura em metabolizar o ácido acético. Este ácido foi completamente assimilado por *Pichia stipitis* em 60 horas de fermentação. A assimilação do ácido acético por *P. stipitis* em hidrolisados hemicelulósicos já havia sido previamente relatada na literatura. Segundo Tran e Chambers (1986), a levedura foi capaz de metabolizar completamente $11,3 \text{ g.L}^{-1}$ deste ácido em hidrolisado hemicelulósico de carvalho vermelho. Do mesmo modo, Díaz et al. (2009) relataram a assimilação de aproximadamente $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ do ácido por *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de poda de oliva. Garcia (2012) relatou que esta levedura foi capaz de assimilar aproximadamente $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ em hidrolisado de bagaço de malte.

Quanto aos furanos, nota-se na Figura 5.48 que tanto o HMF quanto o furfural foram completamente assimilados pela levedura em 12 horas de processo fermentativo. A assimilação de furanos por *P. stipitis* em hidrolisados

hemicelulósicos já havia sido descrita anteriormente (DÍAZ et al., 2009; TRAN; CHAMBERS, 1986).

Com relação aos compostos fenólicos de baixa massa molar, nota-se na Figura 5.48 que a vanilina, presente na concentração de apenas 16 g.L⁻¹, foi completamente assimilada nas 6 primeiras horas de fermentação. Por outro lado, o ácido ferúlico, na concentração de 86 mg.L⁻¹, e o ácido *p*-cumárico, cuja concentração foi de 57 mg.L⁻¹, permaneceram no meio com concentrações praticamente inalteradas até o final do processo fermentativo.

A Figura 5.49 mostra o perfil fermentativo de *Pichia stipitis* em meio sintético com composição química semelhante àquela do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, não somente no que se refere ao teor de açúcares como também às concentrações dos seis principais compostos com potencial inibitório avaliados individualmente no presente trabalho. Neste ensaio, também foi realizado o monitoramento das concentrações dos compostos inibidores, e a cinética de sua assimilação está representada na Figura 5.50. A composição completa deste meio foi de 45,8 g.L⁻¹ de xilose, 5,5 g.L⁻¹ de glicose, 24 g.L⁻¹ de arabinose, 2,1 g.L⁻¹ de ácido acético, 105 g.L⁻¹ de furfural, 94 g.L⁻¹ de HMF, 18 g.L⁻¹ de vanilina, 93 g.L⁻¹ de ácido ferúlico e 57 g.L⁻¹ de ácido *p*-cumárico.

Nota-se na Figura 5.45 que, similar ao observado no hidrolisado de bagaço de malte, o consumo de açúcares ocorreu de maneira sequencial, ou seja, a glicose foi consumida completamente nas 12 primeiras horas de processo, enquanto que o consumo de xilose foi iniciado somente após o esgotamento desta hexose no meio. Este comportamento foi discutido anteriormente e é justificado devido a fatores genéticos e de mecanismos de transporte dos açúcares para o interior das células (JEFFRIES et al., 2007; KILIAN; VAN UDEN, 1988). O consumo total da xilose foi observado após 48 horas de processo fermentativo, um tempo inferior àquele observado para o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte (60 horas). Curiosamente, nota-se uma pequena assimilação de arabinose, o que não foi observado em nenhum dos meios avaliados anteriormente. No entanto, isto ocorreu apenas a partir de 48 horas de processo, quando a glicose e a xilose já estavam esgotadas, sugerindo que esta fonte de carbono foi direcionada para o crescimento e não para a

Figura 5.49 - Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose, produção de etanol e crescimento celular de *Pichia stipitis* em meio sintético com composição química semelhante à do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. As cores representam: glicose (—x—), xilose (—◇—), arabinose (—●—), etanol (—■—) e células (—●—).

Figura 5.50 - Cinética de assimilação de compostos ácidos fracos, furanos e fenólicos de baixa massa molar por *Pichia stipitis* em meio sintético com composição química semelhante à do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. As cores representam: ácido acético (—◇—), furfural (—◇—), HMF (—▲—), vanilina (—●—), ácido ferúlico (—x—) e ácido p-cumárico (—■—).

produção de etanol, visto que a concentração celular cresce e a de etanol diminui de 48 horas em diante. De fato, Nigam (2002) já havia descrito um comportamento semelhante para fermentação por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico. O autor também observou o consumo sequencial de açúcares e a assimilação de arabinose pela levedura na ausência de outros açúcares, sendo que os carbonos desta pentose foram direcionados para o crescimento e não para a produção de etanol, segundo este autor.

Quanto à produção de etanol, nota-se na Figura 5.49 que seu valor máximo, $19,4 \text{ g.L}^{-1}$, foi atingido em 36 horas de processo fermentativo. Este valor foi comparável àquele obtido no hidrolisado bagaço de malte, porém em um tempo reduzido. Já a produção de biomassa neste meio semissintético foi superior em 58% quando comparada ao hidrolisado de bagaço de malte, pois atingiu $16,7 \text{ g.L}^{-1}$. Estes resultados sugerem que o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte utilizado no presente trabalho pode conter outras substâncias inibitórias ao metabolismo microbiano, as quais não foram avaliadas neste estudo.

Quanto aos compostos inibidores, observa-se na Figura 5.50 que o perfil de consumo do ácido acético pela levedura no meio semissintético foi similar ao observado no hidrolisado de bagaço de malte, ou seja, o ácido foi assimilado linearmente, porém com uma taxa aproximadamente 1,6 vezes superior à obtida no hidrolisado. Isto é um indicativo de que, além dos compostos inibidores avaliados no presente trabalho, é possível que haja outras substâncias tóxicas no hidrolisado, de natureza química diversa, as quais afetam o metabolismo da levedura.

O comportamento de assimilação de compostos furanos e fenólicos por *Pichia stipitis*, mostrado na Figura 5.50, demonstra que tanto os furanos (furfural e HMF) quanto a vanilina foram completamente assimilados após 6 horas. Já o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico sofreram pequenas variações em suas concentrações, as quais não podem ser conclusivamente atribuídas à assimilação pela levedura no caso do ácido *p*-cumárico, como discutido anteriormente no item 5.6.7.

Com base nos resultados apresentados, é possível inferir que os compostos inibidores avaliados apresentam efeito principal sobre o tempo de consumo de açúcares, de crescimento e de produção de etanol pela levedura, retardando estes parâmetros, assim como observado para o hidrolisado de palha

de arroz. Também nota-se que, apesar de o hidrolisado de bagaço de malte e o meio sintético mimetizando este hidrolisado terem composição química semelhante, é provável que os fatores interferentes do metabolismo microbiano vão além daqueles avaliados no presente estudo, principalmente em função da complexidade química dos hidrolisados de biomassa vegetal. Isto fica evidenciado devido ao fato de os perfis fermentativos observados para o hidrolisado de bagaço de malte e para o meio semissintético quimicamente semelhante ao hidrolisado exibirem diferenças entre si, principalmente com relação ao tempo para consumo de açúcares, produção de etanol e ao crescimento celular.

5.7.3. Parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e bagaço de malte

Os parâmetros fermentativos para a conversão de xilose e glicose a etanol em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e bagaço de malte, bem como nos meios sintéticos mimetizando sua composição, estão reunidos na Tabela 5.23.

Nota-se na Tabela 5.23 que, para todos os meios avaliados, os açúcares foram totalmente consumidos. A maior diferença entre as condições testadas foi com relação ao tempo de assimilação, pois o menor tempo para o consumo (30 horas) foi observado no meio sintético sem adição de inibidores, seguido pelos meios semissintéticos suplementados com os inibidores presentes nos hidrolisados (36 horas). Nota-se ainda que, nas fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (HHPA) e de bagaço de malte (HHBM), foram necessárias 60 horas para que a levedura consumisse totalmente os açúcares. A partir destas observações, ficou demonstrado que os inibidores avaliados interferem na velocidade de consumo de glicose e xilose por *Pichia stipitis*, possivelmente devido à complexidade química dos hidrolisados.

Quanto ao crescimento celular, observa-se na Tabela 5.23 que, no meio semissintético sem inibidores, foram obtidos $16,2 \text{ g.L}^{-1}$ de células em um período de 30 horas, enquanto que nos meios sintéticos mimetizando a composição do HHPA e do HHBM foram atingidos valores similares mas em um período de 60 horas. Desta forma, conclui-se que a ação destes inibidores foi de retardar o

Tabela 5.23 - Parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e bagaço de malte bem como em meios sintéticos mimetizando a composição química destes hidrolisados.

Parâmetros fermentativos	Ensaio				
	Meio sintético	Hidr. Hem. de palha de arroz (HHPA)	Meio sintético semelhante ao HHPA	Hidr. Hem. de bagaço de malte (HHBM)	Meio sintético semelhante ao HHBM
Consumo de açúcares* (%)	99,7 (±0,341)	97,4 (±0,023)	99,9 (±0,086)	99,7 (±0,013)	99,9 (±0,086)
Tempo de cons. de açúcares (h)	30	60	36	60	36
Concentração celular final (g.L ⁻¹)	16,2 (±1,535)	8,6 (±0,099)	14,5 (±0,0)	10,6 (±0,270)	16,7 (±0,190)
Produção de etanol (g.L ⁻¹)	20,2 (±1,564)	21,8 (±0,895)	22,2 (±0,207)	21,7 (±0,155)	19,4 (±0,207)
Tempo de prod. Máx. de etanol (h)	24	48	48	48	36
Y _{P/S} (g/g)	0,38 (±0,011)	0,41 (±0,019)	0,38 (±0,006)	0,45 (±0,003)	0,41 (±0,001)
Y _{X/S} (g/g)	0,25 (±0,037)	0,13 (±0,001)	0,21 (±0,013)	0,14 (±1E-04)	0,13 (±0,132)
Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,84 (±0,065)	0,45 (±0,019)	0,46 (±0,010)	0,45 (±0,003)	0,54 (±0,006)
η (%)	75,0 (±2,25)	80,4 (±3,71)	75,3 (±1,26)	87,9 (±0,510)	80,2 (±0,284)

*Glicose e xilose.

crescimento da levedura, a qual atingiu valores de biomassa comparáveis ao controle, porém no dobro do tempo. Por outro lado, observa-se que, quando *Pichia stipitis* cresceu em HHPA e HHBM, os níveis de biomassa não se aproximaram daquele observado no meio sem inibidores, sendo de 8,6 e 10,6 g.L⁻¹, respectivamente, mesmo após 60 horas de processo fermentativo. Estes resultados permitem inferir que existem outros compostos no hidrolisado que limitam o crescimento da levedura além daqueles avaliados no presente estudo. Ainda com relação à produção de células, nota-se que o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) foi negativamente afetado em todas as condições avaliadas em relação ao controle. Garcia (2012), estudando a produção de etanol por *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, relatou níveis semelhantes de biomassa aos observados no presente estudo, sendo obtidos 8,97 g.L⁻¹ de células em 96 horas a partir de aproximadamente 56 g.L⁻¹ de açúcares, e um $Y_{X/S}$ de 0,13 g/g.

Quanto à produção de etanol, nota-se na Tabela 5.23 que em todas as condições avaliadas foram obtidos níveis de produto semelhantes àquele atingido no controle (20,2 g.L⁻¹). A principal diferença, mais uma vez, foi o tempo necessário para que a levedura atingisse esta produção. Como consequência, os valores de produtividade volumétrica em etanol (Q_P) foram reduzidos de 0,84 g.L⁻¹.h⁻¹, observado no ensaio sem inibidores, para, em média, 0,5 g.L⁻¹.h⁻¹ nos demais meios avaliados. De fato, Chen et al. (2012), ao avaliarem a fermentação de etanol por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz tratado com cal, relataram comportamento semelhante ao observado no presente trabalho. Segundo os autores, a produção máxima de etanol foi de 20,8 g.L⁻¹ a partir de aproximadamente 49 g.L⁻¹ de açúcares em 60 horas de processo fermentativo, resultando em um Q_P de 0,35 g.L⁻¹.h⁻¹. Ao comparar estes resultados em hidrolisado com a fermentação em meio sintético empregando 40 g.L⁻¹ como fonte de carbono, também conclui-se que os maiores impactos foram sobre os tempos de produção, visto que foram atingidos 17,2 g.L⁻¹ de etanol em 28 horas de fermentação, o que resultou em um Q_P de 0,61 g.L⁻¹.h⁻¹.

Garcia (2012), ao realizar ensaios fermentativos por *Pichia stipitis* em HHBM em condições semelhantes às empregadas no presente estudo, relataram uma produção de etanol de 23,6 g.L⁻¹ a partir de aproximadamente 56 g.L⁻¹ de açúcares em 72 horas, o que resultou em uma produtividade de 0,33 g.L⁻¹.h⁻¹.

Nota-se que este autor também encontrou, assim como no presente trabalho, tempos elevados para atingir a máxima produção de etanol.

Com relação ao fator de conversão de substrato em células ($Y_{P/S}$), nota-se na Tabela 5.23 que este parâmetro não sofreu impacto negativo em nenhum dos meios avaliados. Ao contrário, o maior valor de $Y_{P/S}$ (0,45 g/g) foi obtido no HHBM. Isto indica que os compostos inibidores não afetaram a capacidade fermentativa da levedura. Como consequência destes valores de $Y_{P/S}$, a eficiência de conversão (η) nos hidrolisados situou-se em torno de 80%, um valor ligeiramente superior àquele obtido sem os inibidores (75%). Desta forma, nota-se que a conversão de substrato a etanol é favorecida nos hidrolisados, apesar de a produção ocorrer em tempos prolongados. Uma possível explicação para este fato é a complexidade nutricional destes meios, principalmente o HHBM, cujo alto teor proteico tem sido descrito na literatura. De fato, Mussatto e Roberto (2005) relataram um teor de 15,25% de proteínas no bagaço de malte sem adjuntos, e Duarte et al. (2008) encontraram um teor de 24,6% neste material.

Chen et al. (2012) ao realizarem ensaios fermentativos com *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz encontraram $Y_{P/S} = 0,45$ g/g, um valor semelhante ao obtido no presente estudo. Para fermentação em meio sintético utilizando xilose como fonte de carbono, os autores encontraram um $Y_{P/S}$ de 0,43 g/g, ligeiramente menor que o obtido para o hidrolisado, o que causou uma queda de 4% na eficiência de conversão. Garcia (2012), em ensaios fermentativos com a mesma levedura em bagaço de malte, encontraram $Y_{P/S}$ de 0,44 g/g em condições semelhantes às avaliadas no presente estudo. Este valor está de acordo com aquele apresentado na Tabela 5.23.

A partir dos dados obtidos, pode-se concluir que o principal impacto dos compostos inibidores avaliados é com relação ao tempo de produção. Apesar disto, nas condições empregadas no presente estudo, não houve impacto sobre a conversão de substrato a etanol, provavelmente devido a fatores nutricionais intrínsecos aos hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal, principalmente ao HHBM. De fato, Huige (2006), Öztürk, et al. (2002) e Finley e Hanamoto (1980) já haviam ressaltado o valor nutricional do bagaço de malte devido à sua natureza altamente proteica, destacando a utilização deste material como aditivo na alimentação animal e até mesmo humana. De acordo com Slininger, Gorsich e Liu (2009), a composição nutricional do meio de fermentação no que se refere à fonte

de nitrogênio e de minerais pode alterar a tolerância de *Pichia stipitis* aos compostos inibidores presentes em hidrolisados de biomassa vegetal. De fato, segundo estes autores, o enriquecimento do meio de cultivo com aminoácidos aumentou a tolerância de *P. stipitis* ao furfural e ao HMF. Desta forma, conclui-se que uma medida alternativa para melhorar a viabilidade do processo fermentativo em HHPA e HHBM nas condições avaliadas no presente estudo seja a alteração nas formas de condução do processo, e não a remoção dos compostos inibidores do meio de fermentação. Como avaliado por Garcia (2012), o aumento da concentração inicial de células e a otimização do pH podem favorecer o processo fermentativo em meios não destoxificados.

5.8. Efeito comparativo dos inibidores sobre os parâmetros fermentativos em concentrações presentes nos hidrolisados-modelo

Para efeito de comparação, alguns parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis*, quando exposta aos inibidores individualmente nas concentrações mais próximas àquelas encontradas nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de bagaço de malte, estão sumarizados na Tabela 5.24.

Nota-se que, assim como observado nas fermentações em hidrolisado de palha de arroz e de bagaço de malte, a avaliação individual dos compostos inibidores em concentrações semelhantes àquelas presentes nestes hidrolisados revelou que o fator de conversão de substrato a etanol ($Y_{P/S}$) praticamente não sofreu impacto negativo na presença destas substâncias. Para o controle, o $Y_{P/S}$ foi de 0,38 g/g, enquanto que na presença dos compostos inibidores, o fator de conversão esteve entre 0,36 e 0,42 g/g.

Com relação à produtividade (Q_P), observa-se na Tabela 5.24 que este parâmetro sofreu maior impacto que o $Y_{P/S}$ na presença dos inibidores nas concentrações avaliadas. Entre os compostos testados, o ácido acético foi o que causou maior impacto sobre este parâmetro, sendo observadas quedas de 29% e 38% em Q_P quando avaliada a fermentação na presença deste ácido nas concentrações encontradas em hidrolisado de palha de arroz e de bagaço de malte, respectivamente.

Tabela 5.24 – Análise comparativa dos efeitos dos inibidores sobre os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* em concentrações próximas às encontradas nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (HHPA) e de bagaço de malte (HHBM).

Composto	HHPA				HHBM			
	Concentração observada (g.L ⁻¹)	Conc. Testada em meio s. sintético (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Concentração observada (g.L ⁻¹)	Conc. Testada em meio s. sintético (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
Controle	-	-	0,38	0,84	-	-	0,38	0,84
Ácido acético	1,3	1,5	0,37 (2,6%)	0,60 (29%)	1,9	2,0	0,36 (5,3%)	0,52 (38%)
Furfural	0,049	0,043	0,40 (-5,3%)	0,70 (17%)	0,136	0,084	0,41 (-7,9%)	0,71 (15%)
HMF	0,252	0,218	0,39 (-2,6%)	0,64 (24%)	0,082	0,218	0,39 (-2,6%)	0,64 (24%)
Vanilina	0,044	0,079	0,38 (-)	0,83 (1,2%)	0,016	0,079	0,38 (-)	0,83 (1,2%)
Ácido Ferúlico	0,389	0,290	0,42 (-10,5%)	0,79 (6,0%)	0,086	0,105	0,42 (-10,5%)	0,87 (-3,6%)
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,161	0,150	0,38 (-)	0,78 (7,1%)	0,057	0,045	0,41 (-7,9%)	0,83 (1,2%)

Os valores mostrados entre parênteses indicam o impacto negativo causado pela presença do inibidor quando comparado ao controle. Valores positivos significam queda, valores negativos significam aumentos.

Já os compostos furanos causaram reduções moderadas nos valores de Q_P . Nota-se na Tabela 5.24 que as quedas nas produtividades resultantes da presença de furfural e HMF no meio de fermentação foram da ordem de 20%, o que representa menor toxicidade para o metabolismo fermentativo da levedura quando comparado ao ácido acético.

Por outro lado, observa-se na Tabela 5.24 que o efeito dos compostos fenólicos, tanto aldeídos quanto ácidos, não foi expressivo nas concentrações avaliadas, pois as reduções observadas em Q_P foram menores que 10%. Entretanto, vale ressaltar que foram observados efeitos negativos destes compostos sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis*, porém somente quando se encontravam em concentrações acima das observadas nos hidrolisados de palha de arroz e de bagaço de malte.

Com base nos resultados apresentados, é possível estabelecer uma relação entre a classe de compostos analisados e sua toxicidade nas concentrações encontradas nos hidrolisados de palha de arroz e de bagaço de malte nas condições avaliadas no presente estudo. Esta relação, em ordem crescente, está representada no esquema a seguir:

Desta forma, por meio da análise da Tabela 5.24, conclui-se que a produtividade do processo foi mais afetada pela presença dos inibidores que a conversão de substrato em etanol, e que o ácido acético, presente nas mais altas concentrações, foi o composto que causou maior impacto negativo sobre este parâmetro fermentativo. Os compostos furanos afetaram moderadamente a produtividade do processo, enquanto que os fenólicos praticamente não causaram redução nos valores de Q_P .

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- Os principais compostos inibidores identificados nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de bagaço de malte por meio das metodologias empregadas foram: ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), vanilina, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico.
- O ácido acético, em concentrações entre 1,5 e 4,5 g.L⁻¹, causou impacto negativo proporcional à sua concentração inicial sobre consumo de açúcares, crescimento celular e produção de etanol e, apesar de não ter afetado a conversão de substrato a etanol ($Y_{P/S}$), resultou em quedas de até 77% na produtividade (Q_P).
- A assimilação de ácido acético por *Pichia stipitis* em meio semissintético ocorreu linearmente, a uma taxa constante de 0,05 g.L⁻¹.h⁻¹ independentemente de sua concentração inicial.
- Os compostos furanos afetaram primariamente o crescimento da levedura (redução de aproximadamente 10% em todos os níveis) e, apenas nas maiores concentrações avaliadas (84 mg.L⁻¹ para o furfural e 553 mg.L⁻¹ para o HMF), houve impacto sobre a produção de etanol. O hidroximetilfurfural, na concentração de 553 mg.L⁻¹, foi o que apresentou a maior redução nos valores de $Y_{P/S}$ (~30%) e Q_P (~50%) em relação ao controle.
- A levedura *Pichia stipitis* foi capaz de assimilar prontamente (4 horas) os compostos furanos do meio de fermentação nas condições avaliadas, independentemente de sua concentração inicial.
- Entre os compostos fenólicos, o siringaldeído foi o que causou o maior impacto sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis*, uma vez que reduziu todos os parâmetros fermentativos com o aumento de sua

concentração no meio, causando perdas de até 74% na produção de etanol.

- A vanilina, em concentrações entre 55 e 175 mg.L⁻¹, afetou primariamente o crescimento celular de *Pichia stipitis* nas condições avaliadas (redução de aproximadamente 16% em todos os níveis). Seu impacto sobre a produção de etanol (33%), Y_{P/S} (24%) e Q_P (46%) foi observado apenas no maior nível.
- Os ácidos fenólicos (ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico) reduziram principalmente o crescimento de *Pichia stipitis*, em um nível proporcional à concentração dos compostos no meio de fermentação. O ácido ferúlico reduziu o valor de Q_P (35%) em concentrações a partir de 567 mg.L⁻¹, e o ácido *p*-cumárico diminuiu Q_P (25%) e Y_{P/S} (37%) em concentrações a partir de 319 mg.L⁻¹, indicando que estes ácidos são nocivos ao metabolismo fermentativo da levedura apenas em altas concentrações.
- A levedura *Pichia stipitis* foi capaz de converter os aldeídos fenólicos parcialmente (siringaldeído) ou totalmente (vanilina) em seus respectivos produtos de redução (álcool vanilil) e/ou oxidação (ácido siríngico e ácido vanílico).
- A levedura *Pichia stipitis* apresentou capacidade limitada de assimilação dos ácidos fenólicos, sendo observada assimilação parcial do ácido ferúlico e nenhuma assimilação do ácido *p*-cumárico.
- Nas fermentações em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de bagaço de malte não destoxificados, o processo ocorreu mais lentamente quando comparado com a fermentação em meio semissintético, possivelmente devido à presença dos inibidores, o que afetou o Q_P. A conversão de substrato a etanol não foi afetada negativamente, sendo inclusive favorecida em hidrolisado de bagaço de malte, possivelmente devido às propriedades nutricionais deste meio.

- Os compostos inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de bagaço de malte vão além daqueles avaliados no presente estudo, visto que, nas fermentações em meios semissintéticos mimetizando a composição química destes hidrolisados, a inibição sobre o crescimento celular da levedura e o tempo de consumo de açúcares foram menores quando comparados àqueles observados nos hidrolisados originais.
- Entre os seis principais compostos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de bagaço de malte, nas concentrações encontradas ao fermentá-los, o ácido acético foi o mais inibitório ao metabolismo fermentativo da levedura, seguido pelos furanos e, por último, pelos fenólicos.
- De modo geral, o principal efeito dos compostos inibidores avaliados incide sobre as velocidades do processo (Q_P) e não sobre a conversão de substrato a etanol ($Y_{P/S}$).

REFERÊNCIAS

- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1515-1524, 2008.
- AGRONLINE. **Abertura da colheita do arroz do arroz em Guaratinguetá apresenta o fungicida Brio.** Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/agronoticias/noticia.php?id=18455>>. Acesso em: 10 de abril de 2012.
- ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; RÖDER, A.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M.-F. *Pichia stipitis* xylose reductase helps detoxifying lignocellulosic hydrolysate by reducing 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 12, p. 1-9, 2008.
- ANDO, S.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAI, S. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 64, n. 6, p. 567-570, 1986.
- ASK, M.; BETTIGA, M.; MAPELLI, V.; OLSSON, L. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 22, p. 1-13, 2013.
- BARROS, G. **Produção de cerveja cresce 18% em 2010 e eleva o Brasil a terceiro maior mercado do mundo.** Disponível em: <<http://colunistas.ig.com.br/guilhermearros/2011/01/19/producao-de-cerveja-cresce-18-em-2010-e-eleva-o-brasil-a-terceiro-maior-mercado-do-mundo/>> Acesso em: 27 de maio de 2013.
- BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.
- BELLIDO, C.; BOLADO, S.; COCA, M.; LUCAS, S.; GONZALES-BENITO, G.; GARCIA-CUBERO, M. T. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 10868-10874, 2011.
- BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S., DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, 2010.
- BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana de açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável.** Organização: BNDES e CGEE. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 316 p.

BORNEMAN, W. S. LJUNGDAHL, L. G.; HARTLEY, R. D.; AKIN, D. E. Feruloyl and *p*-coumaroyl esterases from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2: properties and functions in plant cell wall degradation. In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. (Ed.). **Hemicellulose and Hemicellulases**. London: Portland Press Ltd, 1993, p. 85-102. (Portland Press Research Monograph, 4).
BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cana de açúcar**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 12 de março de 2012.

BROWNING, B.L. **Methods of Wood Chemistry**. New York: John Wiley & Sons Inc. 1967. p.882.

BRUINENBERG, P. M.; DEBOT, P. H. M.; VANDIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. NADH-Linked aldose reductase – the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 256-260, 1984.

BUCHERT, J.; NIEMELÄ, K. Oxidative detoxification of wood-derived inhibitors by *Gluconobacter oxydans*. **Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 1-12, 1991.

CAO, Y.; TAN, H. M. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.

CASTRO, R. C. A. **Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* produtora de etanol e sua aplicação no processo de sacarificação e fermentação simultânea da celulignina de palha de arroz**. 2012. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena. 2012.

CHANG, V. S.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 135-159, 1998.

CHEN, W. H.; LIN, T. S.; GUO, G. L.; HUANG, W. S. Ethanol production from rice straw hydrolysates by *Pichia stipitis*. **2011 2nd International Conference on Advances in Energy Engineering (ICAEE)**, v. 14, p. 1261-1266, 2012.

CHO, D. H.; SHIN, S.-J.; BAE, W.; PARK, C.; KIM, Y. H. Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Bioresour. Technology**, v. 101, p. 4947-4951, 2010.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Improved xylitol production in media containing phenolic aldehydes: application of response surfacemethodology for optimization and modeling of bioprocess. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.85, p. 33-38, 2010a.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. **Bioresour. Technology**, v. 101, p. 1858-1865, 2010b.

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.

DIAZ, M. J.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; MOYA, M.; CASTRO, M.; CASTRO, E. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 891-899, 2009.

DUARTE, L. C.; CARVALHEIRO, F.; LOPES, S.; NEVES, I.; GÍRIO, F. M. Yeast biomass production in brewery's spent grains hemicellulosic hydrolyzate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n. 1-3, p. 119-129.

DUPREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* – effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 6, p. 360-364, 1986.

EIA (U. S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION). **Biofuels: ethanol and biodiesel explained.** Disponível em: <
http://www.eia.gov/energyexplained/index.cfm?page=biofuel_ethanol_home>. Acesso em: 12 de março de 2012.

EL MODAFAR, C.; EL BOUSTANI, E. Cell wall-bound phenolic acid and lignin contents in date palm as related to its resistance to *Fusarium oxysporum*. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 1, p. 125-130, 2001.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **The state of food and agriculture: Biofuels: prospects, risks and opportunities.** Roma, 2008. Disponível em: <
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100e/i0100e.pdf>>. Acesso em: 26 de março de 2012.

FENSKE, J. J.; GRIFFIN, D. A.; PENNER, M. H. Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass prehydrolysates. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 364-368, 1998.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.** Berlim: Walter de Gruyter, 1984. 613 p.

FESTEL, G. W. Biofuels - Economic aspects. **Chemical Engineering & Technology**, v. 31, n. 5, p. 715-720, 2008.

FINLEY, J. W.; HANAMOTO, M. M. Milling and baking properties of dried brewer's spent grains. **Cereal Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 166-168, 1980.

FITZGERALD, D. J.; STRATFORD, M.; GASSON, M. J.; UECKERT, J.; BOS, A. NARBAD, A. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*,

Lactobacillus plantarum and *Listeria innocua*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 104-113, 2004.

GARCIA, D. **Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte**. 2012.153 p. Tese (Doutorado em Ciências – Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena. 2012.

GIRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GOLDEMBERG, J.; NIGRO, F. E. B.; COELHO, S. T. **Bioenergia no estado de São Paulo: situação atual, perspectivas, barreiras e propostas**. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2008.

GOLDSTEIN, I. S. Overview of the chemical composition of wood. In: LEWIN, M.; GOLDSTEIN, I. S. (Ed.) **Wood Structure and Composition**. New York: Marcel Dekker, Inc, 1991. p. 1-5. (International Fiber Science and Technology Series, 11).

GROOTJEN, D. R. J.; VANDERLANS, R.; LUYBEN, K. Effects of the aeratoin rate on the fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis* CBS-5773. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 1, p. 20-23, 1990.

GUO, G. L.; CHEN, W. H.; CHEN, W. H.; MEN, L. C.; HWANG, W. S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6046-6053, 2008.

HARRIS, V.; JIRANEK, V.; FORD, C. M.; GRBIN, P. R. Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 2, p. 721-729, 2010.

HASMANN, F. A.; SANTOS, V. C.; GURPILHARES, D. B.; PESSOA-JUNIOR, A.; ROBERTO, I. C. Aqueous two-phase extraction using thermoseparating copolymer: a new system for phenolic compounds removal from hemicelullosic hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 167-173, 2008.

HINMAN, N. D.; WRIGHT, J. D.; HOAGLAND, W.; WYMAN, C. E. Xylose fermentation – an economic-analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 20-1, p. 391-401, 1989.

HON, D. N.-S.; SHIRAISHI, N. **Wood and celulosic chemistry**. New York: Marcel Dekker, 2001. 914 p.

HORVÁT, I. S.; FRANZÉN, C. J.; TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4076-4086, 2003.

HSU, T. C.; GUO, G. L.; CHEN, W. H.; HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4907-4913, 2010.

HU, C.; ZHAO, X.; ZHAO, J.; WU, S. G.; ZHAO, Z. B. K. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 20, p. 4843-4847, 2009.

HUIGE, N. J. Brewery by-products and effluents. In: PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. (Ed.) **Handbook of Brewing**, Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2006, p. 655-713.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Indicadores IBGE: Estatística da produção agrícola, Janeiro de 2013**. Disponível em: <
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201301.pdf>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2013.

IEA (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY). **World energy outlook**. OECD/IEA. Paris, 2009. ISBN: 978 92 64 06130 9.

IEA (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY). **CO₂ emissions from fuel combustion: highlights**. 134 p., 2011. Disponível em: <
http://www.iea.org/publications/free_new_Desc.asp?PUBS_ID=2450>. Acesso em: 26 de março de 2012.

ISHIHARA, T.; MATSUO, J.; ITO, M.; NISHIGUCHI, H.; TAKITA, Y. Porous H-ZSM-5 zeolite tube as a novel application of catalyst for the synthesis of ethanol by hydration of ethylene. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 36, n. 10, p. 4427-4429, 1997.

JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y. S.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 319-326, 2007.

JEPPSSON, H.; ALEXANDER, N. J.; HAHNHAGERDAL, B. Existence of cyanide-insensitive respiration in yeast *Pichia stipitis* and its possible influence on product formation during xylose utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 2596-2600, 1995.

JI, L.; SHEN, Y.; XU, L. L.; PENG, B. Y.; XIAO, Y. Z.; BAO, X. M. Enhanced resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to vanillin by expression of *lacA* from *Trametes* sp. AH28-2. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p.8105-8109, 2011.

KADAM, K. L.; FORREST, L. H.; JACOBSON, W. A. Rice straw as a lignocellulosic resource: collection, processing, transportation, and environmental aspects. **Biomass and Bioenergy**, v. 18. p. 369-389, 2000.

KEATING, J. D.; PANGANIBAM, C.; MANSFIELD, S. D. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 6, p. 1196-1206, 2006.

KELLY, C.; JONES, O.; BARNHART, C.; LAJOIE, C. Effect of furfural, vanillin and syringaldehyde on *Candida guilliermondii* growth and xylitol biosynthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n. 1-3, p. 97-108, 2008.

KILIAN, S. G.; VAN UDEN, N. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 545-548, 1988.

KIM, H.; CHOI, B. The effect of biodiesel and bioethanol blended diesel fuel on nanoparticles and exhaust emissions from CRDI diesel engine. **Renewable Energy**, v. 35, n. 1, p. 157-163, 2010.

KNOCKAERT, D.; RAES, K.; WILLE, C.; STRIJS, K.; VAN CAMP, J. Metabolism of ferulic acid during growth of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus collinoides*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 11, p. 2291-2296, 2012.

KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v. 51, n.1, p. 2-14, 2010.

LARSSON, S.; QUINTANA-SAINZ, A.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, L. J. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-6, p. 617-632, 2000.

LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. Effects of pH and acetic acid on glucose and xylose metabolism by a genetically engineered athenologenic *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 39, p. 301-322, 1993.

LEE, S. H.; BAE, Y. H.; JIN, Y. S.; LEE, O. K.; PARK, Y. C.; SEO, J. H. System Optimization for Lignocellulosic Bioethanol Production Using Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Expressing NADH-Preferable Xylose Reductase and NAD(+)-Dependent Xylitol Dehydrogenase from *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. S11-S11, 2010.

LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; BERHOW, M. A.; KURTZMAN, C. P.; GORSICH, S. W. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 345-352, 2004.

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.

MARTIN, C.; KLINKE, H. B.; MARCET, M.; GARCIA, L.; HERNANDEZ, E.; THOMSEN, A. B. Study of the phenolic compounds formed during pretreatment of sugarcane bagasse by wet oxidation and steam explosion. **Holzforschung**, v. 61, n. 5, p. 483-487, 2007.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 24, n. 2-3, p. 59-83, 2004.

MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 45, n. 3, p. 372-381, 2009.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 37-53, Aug 2009.

MERCK index: **An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 10 ed. New Jersey: Merck and Co., Inc., 1983.

MILLS, T. Y.; SANDOVAL, N. R.; GILL, R. T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, 2009.

MODIG, T.; LIDEN, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 363, p. 769-776, 2002.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics, and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 1, p. 1-14, 2006.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; DRAGONE, G.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C. Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 12, p. 1973-1976, Dec 2007.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 124-129, Aug 5 2008a.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1-10, 2004.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of the Food and Agriculture**, v. 85, n. 14, p. 2453-2460, 2005.

MUSSATTO, S. I. et al. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Cellulose**, v. 15, n. 5, p. 711-721, 2008b.

MUSSOLINI, R. C. **Caracterização físico-química e rendimento da moagem úmida de quatro híbridos de milho**. 2009. 58f. Dissertação (mestrado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo. 2009.

NIGAM, J. N. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. **Journal of Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 107-116, 2002.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17-27, 2001.

NISHIKAWA, N. K.; SUTCLIFFE, R.; SADDLER, J. N. The influence of lignin degradation products on xylose fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5-6, p.549-552, 1988.

OLIVA, J. M.; SAEZ, F.; BALLESTEROS, I.; GONZALES, A.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P. BALLESTEROS, M. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, p. 141-153, 2003.

OLSSON, L.; HAHNHAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

ÖZTÜRK, S.; ÖZBOY, Ö.; CAVIDOGLU, I.; KÖKSEL, H. Effectes of brewer's spent grain on the quality and dietary fibre content of cookies. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n.1, p. 23-27, 2002.

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.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PARACHIN, N. S.; BERGDAHL, B.; VAN NIEL, E. W. J., GORWA-GRAUSLUND, M. F. Kinetic modelling reveals current limitations in the production of ethanol

from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 5, p. 508-517, 2011.

PARAJO, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 1, p. 25-40, 1998.

PARK, J.; KANDA, E.; FUKUSHIMA, A.; MOTOBAYASHI, K.; NAGATA, K.; KONDO, K. OHSHITA, Y.; MORITA, S. TOKUYASU, K. Contents of various sources of glucose and fructose in rice straw, a potential feedstock for ethanol production in Japan. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 8, p. 3733-3735, 2011.

PEREIRA, R. S.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Inhibitory action of toxic compounds present in lignocellulosic hydrolysates on xylose to xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 71-78, 2011.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resources Conservation and Recycling**, v. 50, n. 1, p. 1-39, 2007.

PULS, J.; SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicellulosis: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. (Ed.). **Hemicellulose and Hemicellulases**. London: Portland Press Ltd, 1993, p. 1-27. (Portland Press Research Monograph, 4).

QI, B.; CHEN, X.; WAN, Y. Pretreatment of wheat straw by nonionic surfactant-assisted dilute acid for enhancing enzymatic hydrolysis and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4875-4883, 2010.

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, n. 3, p. 171-176, 2003.

ROCHA, G.J.M. **Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio**. 2000. 136 p. Tese (Doutorado) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

SALAMEH, D.; BRANDAM, C.; MEDAWAR, W.; LTEIF, R., STREHAIANO, P. Highlight on the problems generated by *p*-coumaric acid analysis in wine fermentations. **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1661-1667, 2008.

SAMPAIO, F. C.; TORRE, P.; PASSOS, F. M. L.; DE MORAES, C. A.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Influence of Inhibitory Compounds and minor sugars on xylitol production by *Debaryomyces hansenii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, n. 2, p.165-181, 2007.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from

Candida guilliermondii. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 5p. 315-318, 1988.

SANCHEZ, S.; BRAVO, V.; CASTRO, E.; MOYA, A. J.; CAMACHO, F. The fermentation of mixtures Of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, n. 6, p. 641-648, 2002.

SANTOS, M. S.; RIBEIRO, F. M. 2005. **Cervejas e Refrigerantes. CETESB. São Paulo. 58 p.**

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Instituto de Economia Agrícola. **Levantamento censitário de unidades de produção agrícola do Estado de São Paulo - LUPA 2007/2008.** São Paulo: SAA/CATI/IEA, 2008. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa>>. Acesso em: 17/12/2012.

SHAHABUDDIN; RAHMAN, A.; HADI, S. M. Reaction of furfural and methylfurfural with DNA – use of single-strand-specific nucleases. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, n. 10, p. 719-721, 1991.

SHATALOV, A. A.; PEREIRA, H. Xylose production from giant reed (*Arundo donax* L.): Modeling and optimization of dilute acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 210-217, 2012.

SILVA, J. P. A.; MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 151-156, 2011.

SILVA, J. P. A.; MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 259-265, 2012.

SINGH, A.; BISHNOI, N. R. Optimization of enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw and ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1785-1793, 2012.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry: fundamentals and applications.** California: Academic Press, 1993. 293 p.

SLININGER, P. J.; GORSICH, S. W.; LIU, Z. L. Culture nutrition and physiology impact the inhibitor tolerance of the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 778-790, 2009.

SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. **Biofuels.** Great Britain: John Wiley & Sons, Ltd, 2009. 242 p.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B., **Química orgânica, 1, 8ª Ed.** Rio de Janeiro: LTC, 2005.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 701-708, 2000.

TAMAKAWA, H.; IKUSHIMA, S.; YOSHIDA, S. Ethanol Production from Xylose by a Recombinant *Candida utilis* Strain Expressing Protein-Engineered Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 10, p. 1994-2000, 2011.

TRAN, A. V.; CHAMBERS, R. P. Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 7, p. 439-444, 1986.

UNICA (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR). **Produção Brasil: produção de etanol no Brasil**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em: 12 de março de 2012.

VAN ZYL, C.; PRIOR, B. A.; DU PREEZ, J. C. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 1, p. 82-86, 1991.

WAHLBOM, C. F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Furfural, 5-Hydroxymethylfurfural and acetoin, act as external electron acceptor during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 2, p. 172-178, 2002.

WEI, W.; WU, S.; LIU, L. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated eucalyptus chips for fermentable sugar production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 302-307, 2012.

WHITE, J. S.; YOHANNAN, B. K.; WALKER, G. M. Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1175-1184, 2008.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass - technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, n. 1, p. 3-16, 1994.

XU, F.; SUN, R.-C.; SUN, J.-X.; LIU, C.-F.; HE, B.-H.; F, J.-S. Determination of cell wall ferulic and *p*-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 207-217, 2005.

YU, J. L.; SINGH, D.; LIU, N.; LIAN, J. N.; TAN, T. W.; CHEN, S. L. Construction of a Glucose and Xylose Co-Fermenting Industrial *Saccharomyces cerevisiae* by Expression of Codon-Optimized Fungal Xylose Isomerase. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 5, n. 3, p. 357-364, Sep 2011.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, n. 1, p. 24-33, 1999.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanogenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 5, p. 524-530, 2000.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 17-34, 2001.

ZHAO, X. B.; PENG, F.; DU, W.; LIU, C. M.; LIU, D. H. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 6, p. 993-1004, 2012.