UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

BRUNO GUEDES FONSECA

Avaliação das condições do tratamento biológico de
hidrolisados hemicelulósicos visando melhorar a produção
de etanol por *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*

Lorena
2014

BRUNO GUEDES FONSECA

Avaliação das condições do tratamento biológico de
hidrolisados hemicelulósicos visando melhorar a produção
de etanol por *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*

Tese apresentada à Escola de
Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências do Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia
Industrial na área de concentração
Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Inês
Conceição Roberto

Versão Original

Lorena
2014

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

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
Serviço de Biblioteca EEL/USP
Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP

Fonseca, Bruno Guedes

Avaliação das condições do tratamento biológico de hidrolisados hemicelulósicos visando melhorar a produção de etanol por *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* / Bruno Guedes Fonseca; orientadora Inês Conceição Roberto. -- Versão original.-- Lorena, 2014.
186p.: fig.

Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de concentração: Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Etanol 2. *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* 3. *Saccharomyces cerevisiae* 4. Biotratamento 3. Hidrolisado Hemicelulósico. I.Título. II. Roberto, Inês Conceição, Orient.

CDU – 574.6

*A todos aqueles que torceram por mim e se
fizeram presentes, intelectual e
emocionalmente.*

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à minha orientadora, Profa. Dra. Inês Conceição Roberto, pela orientação, paciência e, acima de tudo, pelo aprendizado proporcionado.

Aos meus amigos hispanohablantes, Alberto Moya, Soledad Mateo e Juan Gabriel, agradeço pelo carinho, hospitalidade e orientação. Vocês são especiais!

Quero agradecer aos meus amigos de laboratório, Isabela, Bárbara, Túlio, João, Livia e Daniely Garcia, pelas risadas, cafés, bolos, “cuecas viradas”... Especialmente aos amigos Daniela Cortez, Rafael e Bel (Best) por terem sido aquele ouvido em todas as horas.

A Sandra, Ana, Cida e Regina Horta, pelo sorriso sempre estampado no rosto e por estarem sempre dispostas a ajudar.

A todos os funcionários e corpo docente do Departamento de Biotecnologia Industrial, muito obrigado.

A TODOS os amigos e colegas de pós, principalmente ao Flávio Ferraz, Juan Daniel e Paula Damião, pelo carinho e amizade.

Às “eternas fias”, Andrea, Carolina e Juliana, minhas grandes amigas que, mesmo distantes, sempre se fizeram presentes. Vocês foram peças-chave em minha jornada em Lorena.

Aos meus queridos amigos Nelson e Alessandro, que me acolheram e foram capazes de me fazer sorrir mesmo nos momentos de tristeza. Vocês já fazem parte da minha família.

Agradeço à CAPES e ao Programa Ciência Sem Fronteiras, pelo apoio financeiro.

À minha família as mais importantes palavras: obrigado por depositarem em mim a confiança para todas as horas. Sei que atingi uma etapa que nenhum outro de nós já havia

conseguido e todo o orgulho que hoje vocês sentem por mim, converterei em uma obrigação de a cada dia ser mais digno de fazer parte de vocês.

RESUMO

FONSECA, B.G. **Avaliação das condições do tratamento biológico de hidrolisados hemicelulósicos visando melhorar a produção de etanol por *Scheffersomyces (Pichia) stipitis***. 2014. 186p. Tese de Doutorado em Ciências – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a capacidade de *Saccharomyces cerevisiae* em metabolizar os compostos tóxicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (HHPA) e de poda de oliveira (HHPO), visando a obtenção de hidrolisados com menor grau de toxicidade para *Pichia stipitis*. Após determinada a composição dos hidrolisados (açúcares e compostos tóxicos) foi avaliado o nível de concentração do HHPA capaz de inibir o metabolismo de *P. stipitis*. Em seguida, foi avaliado o efeito do tempo, concentração de *S. cerevisiae*, pH e aeração sobre a composição destes hidrolisados, tendo como resposta a fermentabilidade de *P. stipitis*. Nas condições otimizadas do biotratamento, as fermentações de *P. stipitis* foram conduzidas em frascos agitados e em biorreator, e as respostas avaliadas foram o consumo de D-xilose, fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P). Os ensaios de biotransformação destes hidrolisados, assim como do meio sintético (MS), o qual mimetizou o teor de açúcares e compostos tóxicos presentes no HHPA, mostraram que as modificações na composição destes meios foram dependentes do tempo de tratamento. Durante o tratamento, a levedura *S. cerevisiae* foi capaz de consumir apenas a D-glicose com baixas produções de etanol glicerol e ácido acético. Além disso, no HHPA e MS o 5-HMF e furfural foram quase que totalmente assimilados (> 90%), com formação de baixos teores de ácido furóico. Nestes meios, *S. cerevisiae* converteu parcialmente os ácidos ferúlico (15%) e *p*-cumárico (20%), sendo observado apenas produto de conversão do ácido ferúlico (álcool vanilil). A vanilina foi completamente assimilada em MS, porém, em HHPA foi constatado um residual do composto (42%), sendo o álcool vanilil o principal produto de conversão. Em relação ao HHPO foi observada assimilação de 47% de furanos totais e 11% de fenólicos totais, não sendo identificados produtos de conversão. Os resultados da fermentação de *P. stipitis* em HHPA mostraram que o tratamento biológico por 6 horas favoreceu o consumo de D-xilose e a produção de etanol, indicando que este parâmetro é um importante fator a ser considerado. Nestas condições, o consumo de D-xilose foi de 57% com produção de 9 g/L de etanol ($Y_{P/S} = 0,18$ g/g e $Q_P = 0,086$ g/L.h). Os resultados da fermentação do HHPO apresentaram valores inferiores de $Y_{P/S}$ (0,14 g/g) e Q_P (0,060 g/L.h) quando comparados ao HHPA, o que indica um maior grau de toxicidade deste hidrolisado. Em relação ao MS, verificou-se que o biotratamento favoreceu em aproximadamente 40% o consumo de D-xilose e a produção de etanol por *P. stipitis*, quando comparado com o MS não-tratado. As melhores condições de concentração de *S. cerevisiae* (5 g/L), pH (3,0) e fator de aeração (6,5) definidas no HHPA através de um planejamento experimental, proporcionou um consumo de 67% de D-xilose por *P. stipitis*, com produção de 13,5 g/L de etanol ($Y_{P/S} = 0,24$ g/g e $Q_P = 0,15$ g/L.h). Na fermentação em biorreator, *P. stipitis* foi capaz de consumir totalmente a D-xilose, produzindo 23 g/L de etanol, após 44 horas. Com base nestes resultados, pode-se concluir que o tratamento dos hidrolisado hemicelulósicos com *S. cerevisiae* é uma técnica promissora capaz de diminuir o grau de toxicidade destes meios com consequente melhoria em sua fermentabilidade, especialmente na velocidade de produção de etanol.

Palavras-chave: Etanol, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e poda de oliveira, biotratamento, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

FONSECA, B.G. **Evaluation of biological treatment conditions of hemicellulosic hydrolysates aiming to improve ethanol production by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*** 2014. 186p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

The aim of this work was to study the ability of *Saccharomyces cerevisiae* to metabolize a variety of toxic compounds found in rice straw (RSHH) and olive tree pruning (OTHH) hemicellulosic hydrolysates, in order to obtain hydrolysates with lower toxicity for *Pichia stipitis*. After determined the hydrolysate composition (sugar and toxic compounds) was evaluated the RSHH concentration level able to inhibit the *P. stipitis* metabolism. Then, the effect of time, *S. cerevisiae* concentration, pH and aeration on the hydrolysates composition was evaluated, and the fermentation was used as response. Under optimized conditions of biotreatment, *P. stipitis* fermentations were conducted in shake flasks and in bioreactor. In relation to the biotransformation assays of these hydrolysates, as well as synthetic medium (SM), with the same sugar and toxic compounds concentrations found in RSHH, the results showed that changes in the media compositions were dependent on the treatment time. During the treatment, *S. cerevisiae* consumed only D-glucose with low ethanol, glycerol, and acetic acid production. Furthermore, in SM and RSHH media, 5-HMF and furfural were almost completely assimilated (> 90 %), with low levels of furoic acid formation. In these media, *S. cerevisiae* partially converted ferulic acid (15%) and p-coumaric acid (20%), being observed only the conversion product of ferulic acid (vanillyl alcohol). Vanillin was totally assimilated in SM, however a residual of this compound (42%) was observed in RSHH, being vanillyl alcohol the main conversion product. Regarding OTHH was observed the assimilation of total furans (47%) and total phenolic (11%), and no conversion products were identified. The results from the *P. stipitis* fermentation in RSHH showed that biotreatment for 6 hours favored D-xylose consumption and ethanol production, indicating that this parameter is an important factor to be considered. In these conditions, D-xylose consumption was 57% with 9 g/L ethanol production ($Y_{P/S} = 0.18$ g/g $Q_P = 0.086$ g/Lh). The results of OTHH fermentation showed lower $Y_{P/S}$ (0.14 g/g) and Q_P (0.060 g/L.h) compared to RSHH, which indicates a higher degree of toxicity in OTHH. Regarding SM, the biotreatment increased D-xylose consumption and ethanol production by *P. stipitis* in approximately 40%, when compared with untreated-SM. The most suitable conditions of *S. cerevisiae* concentration (5 g/L), pH (3.0) and the aeration factor (6.5) defined in RSHH through an experimental design, provided 67% of D-xylose consumption, and 13.5 g/L ethanol production by *P. stipitis* ($Y_{P/S} = 0.24$ g/g $Q_P = 0.15$ g/L.h). In bioreactor, *P. stipitis* was able to completely consume D-xylose, producing 23 g/L ethanol after 44 hours. Based on these results, it can be concluded that previous treatment of hemicellulose hydrolysates with *S. cerevisiae* is a promising technique capable of reducing the toxicity degree of RSHH and OTHH, with consequent improvement in their fermentability, especially on ethanol production rate.

Keywords: Ethanol, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, hemicellulosic hydrolysate, biotreatment, *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Processos de produção de etanol por via fermentativa.....	23
Figura 2.2 - Estrutura simplificada da fibra vegetal de materiais lignocelulósicos (Modificada de TOMME; WARREN; GILKES, 1995).....	25
Figura 2.3 - Ilustração esquemática de uma cadeia de celulose (FENGEL; WEGENER, 1989).....	26
Figura 2.4 - Estrutura das diferentes cadeias de homoxilanas de acordo com o tipo de ligação: (A) β -(1-3), (B) β -(1-4) e (C) β -(1-3, 1-4). (Modificado de EBRINGEROVA, 2006).	28
Figura 2.5 - Estrutura primária do (A) ácido 4- <i>o</i> -metil-glucuronoxilana e da (B) (L-arabino)-4- <i>o</i> -metil-glucuronoxilana presentes nas espécies folhosas e coníferas, respectivamente (EBRINGEROVA, 2006).	29
Figura 2.6 - Estrutura geral demonstrando as várias ligações encontradas nas arabinoxilanas isoladas a partir de paredes celulares de gramíneas (Adaptado de DODD; CANN, 2009).	30
Figura 2.7 - Precursores da lignina: (a) álcool trans- <i>p</i> -cumaril, (b) álcool coniferil e (c) álcool trans-sinapil (HON; SHIRAISHI, 2000).	31
Figura 2.8 – Produtos e subprodutos provenientes da indústria processadora de oliveira (valores baseados na produção da região de Andaluzia - <i>Consejería de Agricultura y Pesca</i> , 2011).	36
Figura 2.9 - Etapas da fermentação de D-xilose: (A) leveduras em geral e (B) <i>Pichia stipitis</i> . (Adaptado de JEFFRIES, 1983).	39
Figura 2.10 - Propostas dos mecanismos de inibição dos furanos, ácidos alifáticos fracos e compostos fenólicos em células de leveduras. ADH (álcool desidrogenase), PDH (piruvato desidrogenase), ALDH (aldeído desidrogenase), HA (ácidos alifáticos fracos). (Modificado de ALMEIDA et al., 2007).	49
Figura 2.11 - Fórmula estrutural e massa molar dos principais ácidos alifáticos presentes em hidrolisado hemicelulósico de biomassa vegetal.	50
Figura 2.12 - Fórmula estrutural e massa molar dos principais compostos furânicos presentes em hidrolisado hemicelulósico de biomassa vegetal.	52
Figura 2.13 - Efeito do furfural no fluxo metabólico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TMB3400. Os valores são expressos como porcentagem de moles de consumo de D-glicose. PPP (via das fosfopentoses). (Modificado de HEER; HEINE; SAUER, 2009).	53
Figura 2.14 - Formas estruturais de alguns dos principais compostos fenólicos de ocorrência natural presentes em hidrolisado hemicelulósico proveniente da poda de oliveira.	56
Figura 2.15 – Mecanismo químico proposto para a obtenção do poli(catecol) catalisado por lacase (AKTAS; TANYOLAC, 2003).	64
Figura 2.16 - Biodegradação de catecol e dos ácidos protocatecóico e gentístico até a formação de intermediários do ciclo de Krebs. (Modificado de SMITH, 1994).	66

Figura 2.17 - Representação gráfica da via metabólica do (a) 5-HMF e (b) furfural (B) em <i>Cupriavidus Basilensis</i> HMF14. Símbolos coloridos indicam enzimas com as seguintes atividades: furfural/5-HMF oxirredutase (laranja); ácido 2,5-furano-dicarboxílico descarboxilase (vermelho); 2-furoil-CoA sintetase (azul); furoil-CoA desidrogenase (amarelo); 2-oxoglutaroil-CoA hidrolase (roxo). Círculos tracejados indicam aldeído e álcool desidrogenase não específicos. O quadrado preto indica hidrólise da lactona e as reações entre parênteses indicam tautomerização ceto-enólico. ACC indica acceptor oxidado (Ox) ou reduzido (Red). (Modificado de KOOPMAN et al., 2010).	68
Figura 2.18 - Ilustração esquemática demonstrando a conversão de furanos e compostos fenólicos em células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Modificado de LIU, 2011).	71
Figura 2.19 - Ilustração esquemática das vias metabólicas da D-glicose e conversão de furfural e 5-HMF por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Níveis normais das reações, expressões ou percursos (setas pretas); níveis reforçados (setas verdes) e expressões, reações ou caminhos reprimidos (setas vermelhas). As etapas-chave da regeneração de NADPH estão representadas por círculos azuis e as reduções dos aldeídos em círculo laranja. As linhas pontilhadas representam as interações de regeneração dos cofatores. FM (álcool furfuril) e FDM (álcool-HMF). (Modificado de LIU, 2011).	73
Figura 2.20 - Via proposta para o catabolismo de ácido ferúlico em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , conforme verificado para outros micro-organismos, como por exemplo, em <i>Debaryomyces hansenii</i> . (Modificado de MATHEW; ABRAHAM; SUDHEESH, 2007).	76
Figura 4.1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comercial liofilizada Dr. Oetker®.	79
Figura 5.1 - Espectro de varredura na região do ultravioleta dos hidrolisados hemicelulósicos de (A) palha de arroz (original: linha preta e concentrado: linha vermelha) e (B) poda de oliveira (original: linha azul e concentrado: linha laranja).	100
Figura 5.2 - Consumo de (A) D-glicose, (B) D-xilose, (C) L-arabinose e (D) ácido acético, (E) crescimento celular e (F) produção de etanol quando cultivada a levedura <i>Pichia stipitis</i> em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com concentrações de açúcares totais de 130 g/L (■), 105 g/L (●) e 80 g/L (▲).	102
Figura 5.3 - Consumo de D-glicose (■), D-xilose (■), L-arabinose (■) e ácido acético (■), crescimento celular (■) e produção de etanol (■) quando cultivada a levedura <i>Pichia stipitis</i> em hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira contendo 80 g/L de açúcares totais.	103
Figura 5.4 - (A) Consumo de açúcares e (B) formação de biomassa, etanol e glicerol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio sintético contendo individualmente ácido acético (vermelho), 5-HMF (azul), furfural (verde), vanilina (preto), ácido ferúlico (laranja), ácido <i>p</i> -cumárico (amarelo) e em combinação (vinho). ..	105
Figura 5.5 - Perfil de assimilação dos principais compostos tóxicos avaliados individualmente e seus produtos de conversão por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	107
Figura 5.6 - (A) Perfil de assimilação de ácido acético (■), 5-HMF (■), furfural (■), vanilina (■), ácido <i>p</i> -cumárico (■) e ácido ferúlico (■), (B) formação de ácido furóico (●), álcool vanilil (●) e ácido vanílico (●) e (C) espectro de varredura na região do ultravioleta durante tratamento biológico do meio sintético por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	109

- Figura 5.7 - (A) Consumo de açúcares, (B) ácido acético e (C) formação de produtos metabólicos por *Saccharomyces cerevisiae* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. D-glicose (■), D-xilose (■), L-arabinose (■), etanol (■) e glicerol (■)..... 112
- Figura 5.8 – Assimilação de (A) ácido acético, (B) furanos, (C) compostos fenólicos e (D) espectro de varredura na região do ultravioleta durante o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*. 5-HMF (●), furfural (●), ácido furóico (●), vanilina (▶), álcool vanilil (▶), ácido vanílico (▶), ácido sirínico (▶), ácido *p*-cumárico (▶) e ácido ferúlico (▶). 113
- Figura 5.9 – (A) Consumo de D-glicose (■), D-xilose (■) e L-arabinose (■), formação de etano (■) e glicerol (■), (B) assimilação de ácido acético (●), furanos (●) e fenólicos (●) e (C) varredura espectral na região do ultravioleta durante o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira por *Saccharomyces cerevisiae*. 115
- Figura 5.10 - (A) Consumo de D-glicose, (B) D-xilose, (C) L-arabinose, (D) crescimento celular e (E) produção de etanol por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, submetidos à biotratamento por *Saccharomyces cerevisiae*. HT₀ (■), HT₂ (●), HT₄ (▲), HT₆ (▼), HT₈ (◀) e HT₁₀ (▶)..... 118
- Figura 5.11 - (A) Consumo de D-glicose (■), D-xilose (■), L-arabinose (■), (B) crescimento celular (●) e produção de etanol (●) por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira. Hidrolisado não-tratado (símbolo aberto) e hidrolisado previamente tratado com *Saccharomyces cerevisiae* por 6 horas (símbolo fechado)..... 121
- Figura 5.12 - (A) Consumo de D-xilose (quadrado) e L-arabinose (círculo), (B) crescimento celular (triângulo) e produção de etanol (estrela) e (C) parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis*. Sem compostos tóxicos não-tratado (preto), com compostos tóxicos não-tratado (vermelho) e biotratado com *Saccharomyces cerevisiae* por 6 horas (azul). 123
- Figura 5.13 - Consumo de D-glicose (A, B e C) e D-xilose (D, E e F) nas fermentações de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado (HNT - estrela) e biotratado por *Saccharomyces cerevisiae* nas diferentes condições do planejamento experimental: tratamento realizado em pH 3,0 (A e D - quadrado), pH 5,5 (B e E - círculo) e pH 8,0 (C e F - triângulo). 128
- Figura 5.14 - Crescimento celular (A, B e C) e produção de etanol de *Pichia stipitis* (D, E e F) quando cultivada a levedura em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado (HNT - estrela) e biotratado por *Saccharomyces cerevisiae* nas diferentes condições do planejamento experimental: tratamento realizado em pH 3,0 (A e D - quadrado), pH 5,5 (B e E - círculo) e pH 8,0 (C e F - triângulo). 129
- Figura 5.15 - (A) Produtividade volumétrica em etanol e (B) fator de conversão de substrato em etanol verificados nas fermentações com *Pichia stipitis* em hidrolisado não tratado (HNT) e tratado por *Saccharomyces cerevisiae* nas diferentes condições proposto pelo planejamento experimental. 130

- Figura 5.16 – Curvas de nível descritas pelo modelo que representa o (A, B e C) fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e (D, E e F) a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) após fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz previamente tratado conforme as diferentes condições do planejamento. Para todos os casos o fator de aeração foi mantido fixo: 3,5 (A e D), 5,0 (B e E) e 6,5 (C e F).....136
- Figura 5.17 - Curvas de nível descritas pelo modelo que representa a máxima redução na concentração de (A) 5-HMF, (B) furfural, (C) vanilina, (D) ácido p-cumárico e (E) ácido ferúlico durante tratamento biológico por *Saccharomyces cerevisiae*. Para todos os casos o fator de aeração foi mantido fixo em seu nível máximo (6,5).....137
- Figura 5.18 - Consumo de D-glicose (■) e D-xilose (■), crescimento celular (■) e formação de etanol (■) por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz submetidos ao tratamento nas seguintes condições: concentração de *Saccharomyces cerevisiae* (5,0 g/L), pH (3,0) e fator de aeração (6,5).141
- Figura 5.19 - (A) Consumo de açúcares, (B) crescimento celular e (C) produção de etanol por *Pichia stipitis* nos ensaios empregando hidrolisado de palha de arroz não tratado (linha vermelha) e biotratado por *Saccharomyces cerevisiae* por 6 horas.....143

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição química parcial de diferentes biomassas lignocelulósicas provenientes de unidades de produção agrícola	31
Tabela 2.2 - Comparativo de área, produtividade e produção nacional de arroz para a safra de 2012/2013	32
Tabela 2.3 - Estimativa da safra de arroz por regiões administrativas (RA) do Estado de São Paulo – Levantamento em novembro de 2012	33
Tabela 2.4 - Efeito das condições de cultivo em meio semissintético e em hidrolisados hemicelulósicos sobre o crescimento e produção de etanol por diferentes cepas de <i>Pichia stipitis</i>	42
Tabela 2.5 – Concentração dos principais compostos tóxicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos obtidos sob diferentes condições de hidrólise ácida	48
Tabela 2.6 - Formas estruturais dos principais compostos fenólicos de baixa massa molar de ocorrência natural presentes em hidrolisados ácidos hemicelulósicos	55
Tabela 4.1 – Componentes tóxicos adicionados a meios sintéticos visando estudar a biotransformação destes compostos por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
Tabela 4.2 - Níveis e valores dos fatores estudados no planejamento experimental fatorial composto 2^3 com face centrada e quadruplicata no ponto central.....	81
Tabela 5.1 – Componentes estruturais e não-estruturais da palha de arroz e da poda de oliveira.....	94
Tabela 5.2 - Composição química parcial dos principais componentes presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (HHPA) e poda de oliveira (HHPO) obtidos por catálise ácida diluída	96
Tabela 5.3 - Composição química parcial dos principais componentes presentes nos hidrolisados hemicelulósicos concentrados de palha de arroz (HHPAC) e poda de oliveira (HHPOC)	98
Tabela 5.4 - Parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i> em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (HHPA) após diferentes tempos de tratamento com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	119
Tabela 5.5 – Análise comparativa dos parâmetros fermentativos de <i>Pichia tipitis</i> quando cultivada em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (HHPA) e de poda de oliveira (HHPO) e em meio semissintético (MS) tratados por 6 horas com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nas seguintes condições: 10 g/L de células, pH 5,5 e fator de aeração 5,0	124
Tabela 5.6 – Condições do planejamento experimental fatorial composto 2^3 com face centrada e quadruplicata no ponto central	126
Tabela 5.7 – Parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i> após 72 horas de fermentação utilizando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz submetidos as diferentes condições de biotratamento com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de acordo com planejamento fatorial	131
Tabela 5.8 - Efeitos estimados das variáveis significativas no nível de 90% de confiança para o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) de acordo com planejamento fatorial proposto	132
Tabela 5.9 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados sobre o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) de <i>Pichia stipitis</i>	133

Tabela 5.10 - Análise de variância de regressão para os modelos representativos das respostas referentes a fermentação por <i>Pichia stipitis</i> do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz previamente tratado.....	134
Tabela 5.11 – Máxima redução verificada nos teores dos compostos tóxicos avaliados e a influência desta redução nos valores dos parâmetros fermentativos de <i>Pichia stipitis</i>	138
Tabela 5.12 – Soluções numéricas das condições otimizadas de acordo com os critérios adotados	139
Tabela 5.13 - Composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado antes e após tratamento biológico por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nas melhores condições de biotratamento sugeridas pelos modelos matemáticos	140
Tabela 5.14 - Parâmetros fermentativos dos ensaios realizados em biorreator de bancada com hidrolisado não tratado (HNT) e hidrolisado biotratado (HBT)	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HMF - 5-hidroximetilfurfural

ADH - Álcool desidrogenase

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ALDH - Aldeído desidrogenase

CFBMM - Compostos fenólicos de baixa massa molar

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CV - Causa de variação

ED - *Entner Doudoroff*

EMP - *Embden Meyerhof Parnas*

EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

FDCA - Ácido 2,5-furano-dicarboxílico

GL - Graus de liberdade

GRAS - *General Recognized As Safe*

HA - Ácidos alifáticos fracos

HHPA - Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz

HHPO - Hidrolisado hemicelulósico poda de oliveira

HNT - Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado

HTPA - Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz tratado com *Saccharomyces cerevisiae*

IEA-Apta - Instituto de Economia Agrícola

IOC - *International Olive Council*

K_{La} - Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

MS - Meio semissintético

MTBE - *Methyl tert-butyl ether* (Éter Metil Térc-Butílico)

η - Eficiência do processo de bioconversão

p - Nível de significância

PAD - Ácido fenilacrílico descarboxilase

PDH - Piruvato desidrogenase

QM - Quadrado médio

Q_P - Produtividade volumétrica em etanol

SQ - Soma dos quadrados

UNEP - *United Nations Environmental Programme*

UNICA - União da Indústria de Cana-de-açúcar

USDA - United States Department of Agriculture

XDH - Xilitol-desidrogenase

XR - Xilose-redutase

YMDP – Meio de cultivo a base de extrato de malte e levedura, peptona e D-glicose

YPD - Meio de cultivo a base de extrato de levedura, peptona e D-glicose

$Y_{P/S}$ - Fator de conversão de substrato em etanol

$Y_{X/S}$ Fator de conversão de substrato em células

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1. Importância do etanol combustível.....	22
2.2. Materiais lignocelulósicos	25
2.2.1. Palha de arroz.....	32
2.2.2. Poda de oliveira.....	34
2.3. Recuperação da fração hemicelulósica a partir de biomassa vegetal	36
2.4. Metabolismo de D-xilose por <i>Pichia stipitis</i>	38
2.4.1. Fatores que afetam a fermentabilidade de D-xilose por <i>Pichia stipitis</i>	41
2.5. Principais compostos tóxicos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos	47
2.5.1. Ácidos alifáticos fracos	50
2.5.2. Furanos.....	51
2.5.3. Compostos fenólicos	54
2.6. O efeito sinérgico	57
2.7. Métodos de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos	59
2.7.1. Métodos químicos	59
2.7.2. Métodos físicos	61
2.7.3. Métodos biológicos	63
2.8. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como agente de biotransformação de compostos aromáticos.....	70
3. OBJETIVOS.....	77
3.1. Objetivo geral	77
3.2. Objetivos específicos	77
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
4.1. Obtenção e concentração dos hidrolisados hemicelulósicos	78
4.1.1. Matéria-prima.....	78
4.1.2. Hidrólise ácida e concentração dos hidrolisados hemicelulósicos.....	78
4.2. Biotransformação de compostos tóxicos por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
4.2.1. Micro-organismo.....	79
4.2.2. Ensaios de biotransformação em meio sintético	80
4.3. Ensaios de biotransformação em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e poda de oliveira.....	80
4.4. Processo fermentativo	82
4.4.1. Micro-organismo, preparo do inóculo e condições de cultivo	82
4.4.2. Fermentação em frascos agitados.....	83
4.5. Cinética do processo fermentativo em biorreator de bancada	84
4.6. Métodos analíticos	84
4.6.1. Caracterização das matérias-primas	84
4.6.2. Determinação do pH	88
4.6.3. Espectro de varredura na região do ultravioleta.....	89
4.6.4. Determinação da concentração celular.....	89
4.6.5. Determinação dos teores de açúcares, ácido acético, glicerol, xilitol e etanol	89
4.6.6. Determinação dos teores de furfural, 5-hidroximetilfurfural e compostos fenólicos de baixa massa molar.....	90
4.6.7. Determinação dos furanos totais	90
4.6.8. Determinação dos teores dos produtos derivados da lignina (PDL)	90

4.7.	Determinação dos parâmetros fermentativos	91
4.8.	Análise estatística.....	92
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.1.	Caracterização química da palha de arroz e da poda de oliveira	93
5.2.	Obtenção e caracterização do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e de poda de oliveira.....	94
5.3.	Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e de poda de oliveira por <i>Pichia stipitis</i>	101
5.4.	Biotransformação de compostos tóxicos por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio sintético e em hidrolisados hemicelulósicos	104
5.4.1.	Meio sintético.....	104
5.4.2.	Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz	111
5.4.3.	Hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira	114
5.5.	Efeito do tempo de tratamento biológico do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz sobre a produção de etanol por <i>Pichia stipitis</i>	117
5.6.	Efeito da concentração de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , pH e aeração no tratamento biológico do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz sobre a produção de etanol por <i>Pichia stipitis</i>	125
5.6.1.	Análise estatística	131
5.7.	Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (biotratado) por <i>Pichia stipitis</i> em biorreator de bancada	142
6.	CONCLUSÕES	149
	REFERÊNCIAS	151
	APÊNDICE	171

1. INTRODUÇÃO

Um dos objetivos prioritários na estratégia energética mundial é reduzir a elevada dependência dos combustíveis fósseis derivados do petróleo e aumentar a segurança no fornecimento de um combustível sustentável. Atualmente, os combustíveis fósseis ocupam grande parcela da energia consumida em todo o mundo, das quais mais da metade é destinada ao setor de transporte. Esta demanda energética, associada às razões ambientais, tem conduzido a busca de matérias-primas renováveis, sustentáveis e de baixos custos que possam ser utilizados como alternativa às matérias-primas fósseis. Dentre todos os combustíveis automotivos líquidos estudados, o que mais se destaca do ponto de vista econômico e ambiental é o etanol, por apresentar, dentre outras vantagens, uma baixa emissão de gases poluentes durante sua queima.

Uma promissora fonte de matéria-prima para a produção biotecnológica de etanol combustível e de outros produtos, como o xilitol, são os materiais lignocelulósicos. Estes materiais representam uma abundante fonte de energia renovável e de baixo custo, disponível, por exemplo, na forma de resíduos agrícolas e florestais. A utilização destas matérias-primas lignocelulósicas em aplicações biotecnológicas requer a separação dos açúcares fermentescíveis presentes em sua estrutura, através da quebra parcial ou total da hemicelulose, aumentando assim a suscetibilidade da celulose para posterior liberação de D-glicose através da hidrólise enzimática.

A hidrólise com ácido diluído é um dos processos mais comumente empregados para a separação da fração hemicelulósica do material lignocelulósico, devido à sua elevada eficiência em solubilizar D-xilose. Entretanto, vários compostos tóxicos ao metabolismo microbiano são formados durante este processo, prejudicando assim os processos fermentativos. Tais inibidores podem ser agrupados em função de sua origem: 1) produtos de degradação de hexoses e pentoses (furfural e 5-hidroximetilfurfural); 2) produtos de degradação da lignina (ácidos e aldeídos fenólicos) e 3) produtos da estrutura lignocelulósica (ácido acético).

Os tipos e as quantidades destes componentes variam de acordo com a matéria-prima e com as condições de hidrólise empregadas. Portanto, para que os hidrolisados possam ser eficientemente utilizados em processos fermentativos, é de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias que visem minimizar o efeito inibitório

destes compostos, seja através de remoção ou conversão destes em compostos com menor grau de toxicidade.

Diversos métodos de tratamento (físico, químico e/ou biológico) do licor hemicelulósico têm sido propostos para reduzir a concentração dos compostos tóxicos a níveis não inibitórios ao processo fermentativo. No que se refere aos métodos físicos, à adsorção dos inibidores empregando carvão ativado tem se mostrado eficaz na remoção de ácido acético, furanos e compostos provenientes da degradação de lignina, permitindo desta maneira obter melhores resultados nos processos fermentativos. No entanto, estes métodos podem remover quantidades apreciáveis de açúcares do meio. Quanto aos métodos químicos de destoxificação, os quais são baseados em alteração de pH, também têm sido bastante estudados. Nestes métodos, a redução da toxicidade dos hidrolisados está relacionada com a precipitação de íons metálicos e/ou decomposição de furanos que apresentam instabilidade química em determinadas condições de pH. Estes métodos não apresentam resultados satisfatórios e normalmente são empregados em combinação com os métodos físicos. Os chamados métodos biológicos de destoxificação de hidrolisados são aqueles que empregam micro-organismos e/ou enzimas com capacidades de promover modificações na estrutura química dos compostos inibidores, resultando em substâncias de menor toxicidade. Tais metodologias têm sido amplamente estudadas e emergem como uma nova estratégia para reduzir a toxicidade do hidrolisado e consequentemente melhorar a fermentabilidade deste meio. Os sistemas biológicos de destoxificação empregando células microbianas são mais vantajosos do que os extratos enzimáticos uma vez que as enzimas e os cofatores estão bem protegidos dentro do ambiente natural celular, o que torna o sistema catalítico mais estável, além da disponibilidade de todos os cofatores necessários e vias metabólicas para a sua regeneração.

Dentro desta perspectiva, o presente trabalho propõe-se avaliar a potencial aplicação de células de *Saccharomyces cerevisiae* na biotransformação de compostos tóxicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e poda de oliveira visando melhorar o processo fermentativo de produção de etanol por *Pichia stipitis*. A escolha da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo microbiano para o tratamento destes hidrolisados se deve ao fato deste micro-organismo apresentar capacidade metabólica de biotransformar compostos aromáticos (furanos e compostos fenólicos) em compostos com menor grau de toxicidade sem, contudo utilizar o principal açúcar presente na fração hemicelulósica (D-xilose). Além disso, é um micro-organismo não patogênico (GRAS) e um dos principais subprodutos gerados nas indústrias cervejeiras e alcooleiras.

Ressalta-se que a metodologia estudada apresenta um caráter inovador e irá contribuir para os avanços nas pesquisas com fermentação de hidrolisados hemicelulósicos oriundos dos materiais lignocelulósicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância do etanol combustível

O etanol é um produto químico orgânico, incolor e inflamável utilizado em diversos segmentos industriais, sendo empregado como solvente, componente de formulações farmacêuticas, artigos de higiene pessoal, limpeza e alimentícia. Atualmente, a demanda mundial por etanol combustível tem se expandido de forma muito rápida, e esta deverá aumentar ainda mais no futuro próximo, principalmente nos países com elevado consumo de combustíveis automotivos (CARDONA; SÁNCHEZ; GUTIÉRREZ, 2010). Tal projeção se deve a combinação dos seguintes fatores: substituição do MTBE (*Methyl tert-butyl ether* - Éter Metil Térc-Butílico) como aditivo da gasolina (para aumento da octanagem do combustível e como aditivo oxigenado) o qual impacta negativamente o meio ambiente devido ao uso deste éter; adoção de estratégias para a redução/limitação das emissões dos gases precursores do efeito estufa, conforme demandado para alguns países pelo Protocolo de Kyoto; redução da dependência de derivados de petróleo na matriz energética; incentivos à agricultura e às indústrias locais (OUTLAW; COLLINS; DUTTIELD, 2005).

O etanol pode ser obtido a partir de processos químicos ou biotecnológicos. Dentre as vias sintéticas de obtenção do álcool, a hidratação do etileno é o processo mais comumente empregado. No entanto, a produção biotecnológica de etanol é responsável por aproximadamente 95% do volume total do álcool produzido em todo o mundo, sendo caracterizada pela fermentação direta de carboidratos simples, como a sacarose, ou a partir de polissacarídeos, como por exemplo, o amido, a celulose e a hemicelulose (CARDONA; SÁNCHEZ; GUTIÉRREZ, 2010).

A Figura 2.1 apresenta os principais processos de produção biotecnológica de etanol. De uma forma geral, este bioprocessos pode ser dividido em três etapas: 1) pré-tratamento da matéria-prima com a finalidade de liberar os açúcares fermentescíveis, 2) bioconversão dos açúcares em etanol e 3) separação e purificação do álcool, usualmente por destilação (MUSSATTO et al., 2010). De acordo com as matérias-primas empregadas, o etanol pode ainda ser classificado em primeira ou segunda geração. O etanol produzido a partir de matérias-primas açucaradas e/ou amiláceas é denominado etanol de primeira geração e a segunda geração do álcool utiliza como matérias-primas os materiais

lignocelulósicos, constituídos em sua maioria por polissacarídeos tais como a celulose e a hemicelulose.

Figura 2.1 – Processos de produção de etanol por via fermentativa.

No Brasil, o melaço extraído da cana-de-açúcar, contendo sacarose, é a principal matéria-prima empregada para a produção de etanol de primeira geração, sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* o principal micro-organismo usado nesta bioconversão. Estes bioprocessos são comumente realizados por fermentação em batelada alimentada ou por fermentação contínua, com reciclo de fermento em ambos os casos (BASTOS, 2007). Por outro lado, nos Estados Unidos a principal matéria-prima empregada na produção do álcool é o amido proveniente do milho. Para a utilização deste substrato em processos de bioconversão, se faz necessária a hidrólise do polissacarídeo, o qual é decomposto em D-glicose pela combinação das enzimas amilase e amiloglicosidase, pois as leveduras fermentativas não são capazes de utilizar diretamente o amido (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Atualmente os Estados Unidos são os maiores produtores de etanol de primeira geração e, juntamente com o Brasil, respondem por aproximadamente 70% da produção mundial (IEA, 2013). O Brasil aparece no cenário mundial como o segundo maior produtor de etanol de primeira geração e o maior exportador deste combustível, sendo considerado o líder internacional em matéria de combustível alternativo e o primeiro em ter atingido seu uso sustentável (UNICA, 2011). Segundo dados da União da Indústria de Cana-de-açúcar - UNICA (2011), a produção mundial de etanol combustível (de primeira geração) para a safra 2010/2011 foi de aproximadamente 80 bilhões de litros.

O uso de etanol-combustível na matriz energética brasileira é destaque mundial pelo pioneirismo e pelos volumes produzidos e consumidos no país. A produção nacional deste combustível foi iniciada em 1975 através do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que apresentava como objetivo principal a redução na dependência por petróleo importado. Nos primeiros anos de sua implantação, o Proálcool instituiu condições de incentivos e subsídios à instalação de plantas produtoras de etanol no país, possibilitando a modernização técnica das usinas produtoras, do sistema de distribuição do combustível e do setor agrícola a ele ligado (AZEVEDO; SANTOS; MAGALHÃES, 2012). Além disso, o Proálcool impulsionou o desenvolvimento dos motores para a utilização do etanol como combustível e dos motores do tipo *flex-fuel*, utilizados para qualquer mistura etanol-gasolina (SOMAVILLA; GOMES NETO, 2005; MOUSDALE, 2008). Este novo tipo de motor, lançado no Brasil em maio de 2003, com um veículo leve funcionando com combinações arbitrárias de gasolina e etanol, fez do país uma referência mundial (CORREIA, 2005).

Ainda de acordo com Figura 2.1, as etapas envolvidas na produção de etanol a partir de matérias-primas lignocelulósicas (etanol de segunda geração) são mais complexas e os custos de produção ainda são elevados quando comparados aos processos de primeira geração. Devido à estrutura mais complexa destas matérias-primas se fazem necessárias etapas adicionais de pré-tratamento para promover a liberação dos açúcares fermentescíveis, através da quebra parcial ou total da hemicelulose, e aumentar assim a suscetibilidade da celulose para posterior liberação de D-glicose através da hidrólise enzimática (GÍRIO et al., 2010; MUSSATTO et al., 2010).

As pentoses contidas na fração hemicelulósica podem ser fermentadas por leveduras naturais, como por exemplo, do gênero *Candida* e *Pichia* (CHANDEL et al., 2007; SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2013a), ou cepas geneticamente modificadas (MATSUSHIKA et al., 2009), enquanto que a fermentação das hexoses são empregadas

leveduras convencionalmente utilizadas na produção de etanol de primeira geração, como a *Saccharomyces cerevisiae* (BASTOS, 2007).

O grande desafio atual na produção de etanol combustível é a utilização destas matérias-primas lignocelulósicas, uma vez que estes materiais são subprodutos das atividades agrícolas e/ou resíduos industriais, apresentando assim caráter renovável e de baixo valor econômico, e, portanto, de grande potencial para a produção de etanol combustível em larga escala (MOUSDALE, 2008).

2.2. Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas rígidas e fibrosas compostas, majoritariamente, pelos polissacarídeos, celulose e hemicelulose (cerca de 70% da massa seca), entremeados por outra macromolécula denominada lignina (Figura 2.2). Em menores proporções, e dependendo da espécie vegetal, encontram-se os extrativos como graxas, gomas, alcalóides, resinas, óleos essenciais e outros constituintes citoplasmáticos do vegetal e componentes não extrativos, que incluem a sílica, carbonatos e oxalatos (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2.2 - Estrutura simplificada da fibra vegetal de materiais lignocelulósicos (Modificada de TOMME; WARREN; GILKES, 1995).

A celulose é o principal componente da parede celular da fibra vegetal, o qual desempenha uma função estrutural nas células. Trata-se de um homopolissacarídeo linear de alta massa molecular constituído apenas por unidades de β -D-glicopirranose, unidas entre si através de ligações glicosídicas do tipo β -(1-4), conforme demonstrado na Figura 2.3. Tipicamente, cadeias de celulose em parede celular primária de plantas podem apresentar grau de polimerização de até 25.000 unidades. À temperatura ambiente, os anéis relativamente rígidos de D-glicose encontram-se em sua energia mais baixa, ou seja, na conformação tipo cadeira (DUMITRIUS, 2005). Com os anéis nesta conformação, todos os grupos hidroxilas unidos por ligações de hidrogênio e os substituintes hidroximetilas dos anéis de piranose são equatoriais, direcionados à periferia do anel, enquanto os prótons hidrofóbicos alifáticos estão em posições axiais, apontando tanto para cima quanto para baixo, em relação ao plano médio dos anéis (O'SULLIVAN, 1997). Esta configuração resulta em regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias poliméricas apresentam orientação randomizada (HON; SHIRAISHI, 2001).

Figura 2.3 - Ilustração esquemática de uma cadeia de celulose (FENGEL; WEGENER, 1989).

As hemiceluloses, assim como a celulose, pertencem aos componentes estruturais das paredes celulares das plantas superiores, estando associadas às proteínas e a lignina. Dependendo do vegetal e do tipo de célula, as hemiceluloses podem variar tanto na sua composição química quanto estrutural, apresentando grau de polimerização inferior a 200 unidades e cadeias mais curtas com diversos grupos substituintes como ramificações. As hemiceluloses podem conter apenas um tipo de açúcar na cadeia principal, ou seja, cadeias homopolissacarídicas, ou apresentar mais de um tipo de açúcar em seu esqueleto básico, sendo chamadas então de cadeias heteropolissacarídicas (EBRINGEROVA, 2006).

As estruturas hemicelulósicas são sintetizadas em um estágio anterior à lignificação, dando elasticidade e flexibilidade ao agregado e impedindo o contato entre essas microfibrilas. Além de seu envolvimento superficial com as microfibrilas de

celulose, as hemiceluloses também se ligam firmemente entre si, através de ligações cruzadas de hidrogênio. Acredita-se também, que as hemiceluloses estejam envolvidas na regulação da elongação e modificação da parede celular, e que as interações entre hemiceluloses e as microfibrilas de celulose sejam mais fortes do que interações entre as hemiceluloses e ligninas (FENGEL; WEGENER, 1989; GÍRIO et al., 2010).

Quando comparadas à celulose, as hemiceluloses apresentam maior solubilidade em água, além de serem mais facilmente hidrolisadas em meio ácido, devido à sua natureza ramificada e amorfa. Os produtos de hidrólise das hemiceluloses podem gerar unidades monossacarídicas de pentoses (D-xilose e L-arabinose) e/ou hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose), além de outros componentes residuais como a L-ramnose, o ácido D-glucurônico, o ácido D-galactorônico e o ácido 4-*o*-metil-D-glucurônico (FENGEL; WEGENER, 1989; HON; SHIRAISHI, 2000). Estes monossacarídeos encontram-se unidos por ligações glicosídicas, constituindo assim diferentes polissacarídeos que, dependendo da espécie da planta, estágio de desenvolvimento e tipos de tecidos, podem ser subdivididos em xilanas, mananas, galactanas e glucanas (DUMITRIUS, 2005; EBRINGEROVA, 2006).

As xilanas apresentam grandes variedades estruturais; porém, o esqueleto principal desta classe de polissacarídeo é normalmente formado por unidades de D-xilopirranose unidas por ligação do tipo β -(1-4) e podem ser agrupadas em várias subclasses estruturais, como as homoxilanas, heteroxilanas, glucuronoxilanas, arabino-glucuronoxilanas, arabinoxilanas e glucurono-arabinoxilanas (DUMITRIUS, 2005).

Dentre a grande variedade estrutural das xilanas, as heteroxilanas são mais comumente encontradas em plantas terrestres, sendo normalmente observados substituintes monossacarídicos neutros ou ácidos ou, ainda, cadeias laterais de oligossacarídeos ligadas à cadeia principal, além da grande presença de grupamentos *o*-acetil (EBRINGEROVA, 2006). Conforme mostrado na Figura 2.4, as homoxilanas são polissacarídeos lineares, compostos por resíduos de D-xilopirranose, unidos por ligações do tipo β -(1-3) e/ou β -(1-4), substituindo a celulose como esqueleto polimérico das paredes celulares de diversas algas (DUMITRIUS, 2005; GÍRIO et al., 2010).

As glucuronoxilanas são o tipo de xilanas mais comumente presentes nas paredes secundárias de plantas com um nível evolutivo superior, apresentando cadeias laterais formadas por ácido D-glucurônico, conforme mostrado na Figura 2.5. Este tipo de

hemicelulose, presente em 90% das espécies das folhosas, apresenta o grupo substituinte 4-*o*-metil ligado à posição 2 de seu esqueleto principal (EBRINGEROVA, 2006 ; GÍRIO et al., 2010). Além disso, as glucuronoxilanas das folhosas podem conter grupos acetil ligados aos carbonos 2 e/ou 3 por uma ligação do tipo β -(1-4) em uma proporção média de 7 grupos acetil para cada 10 moléculas de D-xilose, e ainda ligadas ao ácido α -D-glucurônico ou ao seu derivado, o ácido 4-*o*-metil-D-glucurônico, por ligações do tipo α -(1-2) (DUMITRIUS, 2005; EBRINGEROVA, 2006).

Figura 2.4 - Estrutura das diferentes cadeias de homoxilanas de acordo com o tipo de ligação: (A) β -(1-3), (B) β -(1-4) e (C) β -(1-3, 1-4). (Modificado de EBRINGEROVA, 2006).

Ainda em relação às glucuronoxilanas, é possível encontrar também, estruturas de arabino-glucuronoxilanas (arabino-4-*o*-metilglucuronoxilanas) como os principais componentes hemicelulósicos das coníferas (Figura 2.5-B). Trata-se de uma cadeia principal de β -(1-4)-D-xilopiranosose contendo o ácido 4-*o*-metil- α -D-glucopiranosil e α -L-arabinofuranosil unidos entre si por ligações glicosídicas do tipo α -(1-2) e α -(1-3), respectivamente. Ao contrário da estrutura hemicelulósica presente nas espécies folhosas, as arabino-glucuronoxilanas não contêm grupamento acetil; porém, contém uma quantidade superior de grupos ácido 4-*o*-metil- α -D-glucurônico, e em ambas as espécies se faz presente unidades de D-ramnose e ácido galacturônico ligado em suas extremidades redutoras (EBRINGEROVA, 2006). É importante ressaltar também que, as glucuronoxilanas das coníferas apresentam um grau de polimerização inferior às espécies folhosas (aproximadamente 130 unidades) e devido a sua característica ácida e as suas

propriedades químicas, essas xilanas são menos susceptíveis à hidrólise ácida do que as glucuronoxilanas presentes nas espécies folhosas (GÍRIO et al., 2010).

Figura 2.5 - Estrutura primária do (A) ácido 4-*o*-metil-glucuronoxilana e da (B) (L-arabino)-4-*o*-metil-glucuronoxilana presentes nas espécies folhosas e coníferas, respectivamente (EBRINGEROVA, 2006).

As arabinoxilanas representam as principais cadeias da hemicelulose das gramíneas, sementes e grãos. Nesta estrutura, a cadeia linear principal formada por β -(1-4)-D-xilopirranose é substituída por unidades de α -L-arabinofuranosil (nas posições 2-orto e/ou 3-orto), e/ou por ácido α -D-glucopiranosil glucurônico e seu derivado 4-*o*-metil na posição 2-orto, além de poder conter também grupos substituintes *o*-acetil (EBRINGEROVA; HROMADKOVA; HEINZE, 2005; EBRINGEROVA, 2006).

Uma das características mais importantes deste tipo de hemicelulose é que os resíduos de arabinofuranosil podem ser esterificados com resíduos de ácidos hidroxicinâmicos na posição 5-*o*, destacando o ácido ferúlico, conforme apresentado na Figura 2.6. Este tipo de xilana apresenta grau de polimerização de aproximadamente 90 unidades e os ésteres feruloil, por exemplo, encontram-se acoplados às cadeias de arabinoxilanas através de uma reação catalisada por peroxidases, com a síntese de um

grupo di-feruloil, formando uma ligação cruzada entre duas cadeias de arabinoxilana (FENGEL; WEGENER, 1984; DODD; CANN, 2009).

Figura 2.6 - Estrutura geral demonstrando as várias ligações encontradas nas arabinoxilanas isoladas a partir de paredes celulares de gramíneas (Adaptado de DODD; CANN, 2009).

O terceiro polímero constituinte da estrutura lignocelulósica é denominado lignina e encontra-se na parede celular de todas as plantas vasculares, sendo responsável pela rigidez e baixa reatividade desses materiais. Sua constituição é baseada em polímeros de fenil-propano altamente irregulares e insolúveis, formando assim uma macromolécula tridimensional e amorfa (SUHAS; CARROTT; CARROTT, 2007).

A Figura 2.7 apresenta os três diferentes álcoois precursores das reações de biossíntese da lignina: álcool trans-*p*-cumaril, álcool coniferil e álcool trans-sinapil, que geram unidades de *p*-hidroxibenzilas, guaiacilas e siringilas, respectivamente. Além dessas unidades de fenil-propanos podem ser encontrados também ácidos *p*-hidroxicinâmicos, como os ácidos *p*-cumárico, ferúlico e sinapílico, integrados à estrutura da lignina, como observado para algumas espécies de gramíneas (SÁNCHEZ, 2009).

Figura 2.7 - Precursores da lignina: (a) álcool trans-*p*-cumaril, (b) álcool coniferil e (c) álcool trans-sinapil (HON; SHIRAISHI, 2000).

Tendo em vista a vasta variedade de biomassas lignocelulósicas provenientes da agroindústria e unidades de produção agrícolas, a Tabela 2.1 apresenta a composição química de diversas matérias-primas que têm sido estudadas na produção de etanol de segunda geração. Segundo Fengel e Wegener (1989), as proporções de celulose:hemicelulose:lignina serão dependentes das condições de crescimento, parte da planta escolhida, idade de colheita e outros fatores biológicos como as diferenças genéticas dentro de uma mesma espécie.

Tabela 2.1 - Composição química parcial de diferentes biomassas lignocelulósicas provenientes de unidades de produção agrícola

Biomassas Lignocelulósicas	% Base Seca		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Sabugo de milho ^a	31,7	34,7	20,3
Bagaço de cana ^b	47,0	27,5	20,3
Palha de arroz ^c	43,5	22,0	17,2
Bagaço de malte ^d	16,8	28,4	27,8
Casca de arroz ^e	36,0	15,0	19,0
Palha de sorgo ^f	35,0	24,0	25,0
Palha de trigo ^g	48,6	27,7	8,2
Poda de oliveira ^h	28,6	13,9	21,4

^aCRUZ et al., 2000; ^bCANILHA et al., 2010; ^cMUSSATTO; ROBERTO, 2001; ^dMUSSATTO; ROBERTO, 2006; ^eKUHAD; SINGH, 1993; ^fHERRERA et al., 2003; ^gSAHA et al., 2005; ^hMATEO et al., 2013.

2.2.1. Palha de arroz

O arroz é uma planta herbácea, da família das gramíneas e do gênero *Oryza*, sendo atualmente a segunda maior cultura cerealífera do mundo, ultrapassada apenas pelo milho. Apesar disso, o comércio internacional desse cereal é pouco expressivo, uma vez que mais de 93% do arroz produzido é consumido no próprio país (CEPA, 2011). De acordo com dados do *United States Department of Agriculture* – USDA (2012), a produção mundial do grão para a safra de 2011/12 foi de 460 milhões de toneladas, sendo 90% dessa produção cultivada e consumida na Ásia, com destaque para China (30,2%), Índia (21,3%), Indonésia (8,2%) e Vietnã (5,6%).

No Brasil, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2013), a área cultivada com arroz para a safra de 2012/2013 está estimada em 2.390,3 mil hectares, o que representa 11.858,3 mil toneladas do grão, ou seja, um acréscimo de apenas 2,2% sobre o volume colhido na safra anterior. A Tabela 2.2 apresenta a produção nacional de arroz para a safra de 2012/2013, tendo a região sul do país como o maior estado produtor do grão, com 1.249,7 mil hectares, o que representa 52% da área nacional, respondendo ainda por 77% da produção brasileira. O estado de São Paulo aparece como o maior produtor da região sudeste, caracterizada com uma produção de aproximadamente 87 mil toneladas, ocupando assim a 13ª posição no ranking nacional.

Tabela 2.2 - Comparativo de área, produtividade e produção nacional de arroz para a safra de 2012/2013

Região	Área (mil ha)	Produtividade (Kg/ha)	Produção (mil t)*
Norte	291,9	3.520	1.030,3
Centro-oeste	216,5	3.223	697,7
Sul	1.249,7	7.308	9.132,9
Nordeste	587,6	1.462	858,9
Sudeste	44,6	3.106	138,5
MG	22,8	1.956	44,6
ES	1,0	2.700	2,7
RJ	1,4	3.100	4,3
SP	19,4	4.480	86,9
Brasil	2.390,3	4.961	11.858,3

Fonte: CONAB, 2013 – Levantamento: julho/2013. * Produção total de arroz

De acordo com o Instituto de Economia Agrícola (IEA-Apta, 2013), a região do Vale do Paraíba (apresentado na Tabela 2.3 como região administrativa de São José dos Campos), ainda é a maior região produtora de arroz do Estado de São Paulo, totalizando 75% da produção estadual. Dados do IEA-Apta (2013) mostram também que a produção de arroz nesta região compete apenas às cidades de Guaratinguetá e Pindamonhangaba, sendo quase exclusivamente provenientes de plantios de arroz irrigado.

Tabela 2.3 - Estimativa da safra de arroz por regiões administrativas (RA) do Estado de São Paulo – Levantamento em novembro de 2012

RA	Arroz de sequeiro e várzea		Arroz irrigado		Total	
	Área	Produção	Área	Produção	Área	Produção
Araçatuba	32	1.734	-	-	32	1.734
Baixada Santista	-	-	-	-	-	-
Barretos	165	9.075	-	-	165	9.075
Bauru	10	200	30	2.100	40	2.300
Campinas	707	32.421	-	-	707	32.421
Central	40	1.100	-	-	40	1.100
Franca	70	2.610	-	-	70	2.610
Marília	224	6.122	650	63.500	874	69.622
Presidente Prudente	24	526	-	-	24	526
Registro	527	32.680	710	76.500	1.237	109.180
Ribeirão Preto	246	15.056	-	-	246	15.056
São José do Rio Preto	107	3.370	80	3.200	187	6.570
São José dos Campos	3	30	11.494	1.067.691	11.497	1.067.721
São Paulo	-	-	-	-	-	-
Sorocaba	1.478	84.549	225	9.583	1.703	94.132
Estado	3.631	189.472	13.188	1.222.574	16.819	1.412.046

Fonte: IEA-Apta, 2013, Área em hectare, Produção em sacos de 60 Kg.

A indústria arrozeira gera, entre outros, dois importantes resíduos agrícolas: a palha e a casca, que são classificados em resíduos de culturas e resíduos agroindustriais, respectivamente. Segundo Lim et al. (2012), os resíduos de culturas referem-se aos restos do plantio que permanecem no campo após a colheita, enquanto os agroindustriais são subprodutos dos processos de colheita, gerados a partir do processamento de limpeza, peneiração e trituração. De acordo com dados do *United Nations Environmental Programme* – UNEP (2009), para cada quilograma de cereal colhido são gerados 1,1 quilograma de palha, o que totaliza aproximadamente 500 milhões de toneladas do resíduo distribuídas em todo o mundo, com um potencial energético para a produção de 150 bilhões de litros de etanol por ano. Levando em consideração a quantidade de palha gerada após o período de colheita do arroz, pode-se constatar para o estado de São Paulo um total de aproximadamente 1,5 milhão de toneladas de palha gerados na safra de 2011/2012.

Em alguns países asiáticos, a queima da palha e da casca, realizada após o período de colheita, tornou-se uma prática comum de manipulação destes resíduos. Na Tailândia, por exemplo, 90% da palha de arroz são queimadas durante o período de colheita, o que representa um desperdício energético, além de trazer ameaças ambientais e à saúde da população local (UNEP, 2009).

Muitos países têm imposto novas regras que restringem as atividades de queima nos arrozais, destinando este resíduo para a alimentação animal (ELSEED, 2005; PI; WU; LIU, 2005), produção de papel (NAVAEE-ARDEH; MOHAMMADI-ROVSHANDEH; POURJOOZI, 2004), produção de carvão ativado (OH; PARK, 2002) e como material de construção civil (YANG et al., 2004). Além disso, a palha de arroz é uma matéria-prima potencial para diversos processos de bioconversão, principalmente para produção de etanol, por apresentar uma estrutura rica em polissacarídeos (SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2010).

2.2.2. Poda de oliveira

A oliveira – *Olea europaea* L. – é uma espécie frutífera da família botânica *Oleaceae*, cujo plantio tem sido realizado em regiões que apresentam clima subtropical ou temperado. A árvore pode apresentar de 3 a 12 metros de altura, sendo formada por grandes folhas coriáceas e lanceoladas, e suas principais características são a longevidade e o desenvolvimento em grande variação de temperatura, podendo suportar baixos valores no inverno (1 a 5°C) e grandes períodos de seca no verão, com temperaturas de

aproximadamente 45°C (VILLA, 2007). Além disso, dentre as 35 espécies do gênero *Olea*, apenas a espécie *Olea europea* L. apresenta frutos comestíveis (LAVEE, 1997).

O cultivo de oliveiras concentra-se em países localizados na costa do Mar Mediterrâneo e representa 95% da produção mundial, sendo que 73% deste cultivo são provenientes de países da União Europeia. Segundo dados do *International Olive Council* – IOC (2012) a produção mundial de azeite e de azeitona de mesa, principais produtos derivados da oliveira, na safra 2007/2008 foi de aproximadamente 2,9 e 2,1 milhões de toneladas, respectivamente. Dentre os países produtores de azeite de oliva destacam-se: Espanha (49%), Itália (19%), Grécia (12%), Tunísia (7%), Síria (4%), Marrocos (3%), Turquia (3%), Portugal (1%), Argentina (1%) e Argélia (1%). Na produção de azeitona de mesa os países que mais se destacam são: Espanha (26%), Egito (20%), Turquia (9%), Estados Unidos (5%), Peru (5%), Marrocos (5%), Síria (5%), Grécia (4%), Argentina (4%) e Argélia (4%).

As novas políticas agrárias de estímulo à produção de azeite de oliva mediante incentivos econômicos e o declínio na produção de outros cultivos, principalmente de trigo, têm contribuído para o aumento da superfície cultivável de oliveiras em toda a Espanha. Segundo a *Consejería de Agricultura y Pesca* (2011), na região sul do país, o cultivo de oliveiras ocupou 1.504.259 ha de área plantada, o que representa 30% da superfície cultivada e aproximadamente 60% do total de árvores plantadas no território espanhol. Além disso, na cidade de Jaén, situada na província de Andaluzia, a plantação de oliveira representa 85% da superfície agrícola.

Quando comparado ao dos países da União Europeia, o cultivo de oliveira no Brasil é pouco expressivo, concentrando principalmente nos estados com clima mais amenos, como o Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Segundo dados da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG (2012) a área plantada de oliveiras para a safra de 2012 no estado do Rio Grande do Sul foi de aproximadamente 600 hectares. Outra região do país com microclimas favoráveis a esta cultura é a Serra da Mantiqueira, com altitudes variando de 1.000 a 2.798 metros, com uma área cultivada de aproximadamente 750 hectares. Esta região abrange 40 municípios mineiros com apoio e estudos pioneiros da EPAMIG, e os municípios paulistas de São Bento do Sapucaí, Campos do Jordão, Lorena, Natividade da Serra, Espírito Santo do Pinhal, Águas da Prata, Santo Antônio do Pinhal, Pedra Bela e Cássia dos Coqueiros. Na Serra da Bocaina, que apresenta altitudes

variando de 1.000 a 2.080 metros e temperaturas médias anuais de 13 a 16°C observam-se também cultivos nas cidades de Silveiras e Cunha (PRELA-PANTANO et al., 2010).

A Figura 2.8 apresenta os produtos e subprodutos derivados da indústria oleica. Verifica-se que um dos principais subprodutos gerado deste cultivo são os resíduos provenientes da poda das árvores, como as folhas, caules e ramos. Entende-se por poda a retirada de ramos ou braços inúteis de plantas, arbusto e/ou árvores, de forma a revigorar ou restringir seu desenvolvimento, conseguir máxima produtividade ou, inclusive, restaurar parte ou a totalidade da árvore, favorecendo assim seu crescimento (GUERRERO, 2003).

Figura 2.8 – Produtos e subprodutos provenientes da indústria processadora de oliveira (valores baseados na produção da região de Andaluzia - *Consejería de Agricultura y Pesca*, 2011).

2.3. Recuperação da fração hemicelulósica a partir de biomassa vegetal

A recalcitrância da matriz lignocelulósica é um dos principais obstáculos para o aproveitamento integral dos polissacarídeos contidos em sua estrutura. Isto implica na necessidade da ruptura do complexo lignocelulósico por técnicas de fracionamento, de

forma a recuperar eficientemente os açúcares fermentescíveis presentes nas frações celulósica e hemicelulósica destes materiais (GÍRIO et al., 2010).

A hidrólise com ácido diluído é um dos processos mais comumente empregados para a separação da fração hemicelulósica da biomassa vegetal, devido à sua elevada eficiência em solubilizar D-xilose (> 65%) e por apresentar baixo custo operacional. Além disso, as condições reacionais empregadas neste método causa pouco impacto sobre a celulose e a lignina (GÍRIO et al., 2010). As principais características deste tipo de hidrólise são o emprego de ácidos minerais, como por exemplo, o ácido sulfúrico, em concentrações que variam de 0,5 a 6,0%, temperaturas moderadas na faixa de 90 a 200°C e tempos de reações inferiores a 300 minutos (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

De acordo com Jeffries, Lightfoot e Fady (1985), a hemicelulose apresenta uma estrutura mais acessível aos agentes deste tratamento quando comparado a celulose, pois sua estrutura ramificada e o baixo grau de cristalinidade possibilita a difusão de ácidos, acelerando assim o processo hidrolítico. Além disso, as ligações glicosídicas entre os monômeros de D-xilose são menos estáveis do que estas ligações entre os monômeros de D-glicose, propiciando uma separação mais simples das pentoses contidas na fração hemicelulósica. O mecanismo de hidrólise da fração hemicelulósica, quando empregado ácido diluído, baseia-se nas etapas descritas por Fuller, McKeon e Bills (1996):

- A. Difusão dos prótons (H^+) através da matriz lignocelulósica úmida;
- B. Protonação do oxigênio de uma ligação éter entre os monômeros de açúcares;
- C. Quebra da ligação éter;
- D. Geração de um carbocátion como produto intermediário;
- E. Solvatação do carbocátion com água;
- F. Regeneração do próton (H^+) com formação de monômeros de açúcares, oligômeros, dímeros ou polímeros, dependendo da posição do grupo éter;
- G. Solubilização na fase líquida dos produtos da reação.

Como resultado desse processo hidrolítico, é gerada uma fase líquida contendo uma mistura de monossacarídeos (pentoses e hexoses) e uma gama de compostos tóxicos ao metabolismo fermentativo de diversos micro-organismos, além de uma fase sólida composta principalmente por celulose e lignina (GÍRIO et al., 2010).

Os teores de açúcares formados durante a hidrólise ácida diluída dos materiais lignocelulósicos irão depender do tipo de biomassa, bem como das condições reacionais empregadas. Roberto, Mussatto e Rodrigues (2003) avaliaram o efeito da concentração de ácido sulfúrico e do tempo de reação sobre a hidrólise da palha de arroz à 121°C, e verificaram que as maiores concentrações de D-xilose (20,5 g/L) e D-glicose (6,3 g/L) foram obtidas com 1,6% H₂SO₄ após 30 minutos de reação, com uma recuperação de 77% da hemicelulose. Resultados semelhantes de recuperação da fração hemicelulósica após processo de hidrólise ácida da palha de arroz foram reportados por Karimi, Kheradmandinia e Taherzadeh (2006). Neste trabalho foi observada uma recuperação de 80% da hemicelulose quando empregada uma temperatura de 201°C, tempo de reação de 10 minutos e concentração de ácido sulfúrico de 0,5%.

Aguilar et al. (2002) avaliaram o efeito da temperatura (100 a 128°C), tempo de reação (0 a 300 minutos) e concentração de ácido sulfúrico (2 a 6%) sobre a hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar. Os autores verificaram que a maior concentração de D-xilose (21,5 g/L), a qual correspondeu a 92% do potencial máximo da pentose, foi obtida na temperatura de 122°C, concentração de H₂SO₄ de 2% e tempo de reação de 20 minutos. Nestas mesmas condições, foi verificada formação de 2,1 g/L de D-glicose.

Ao avaliarem o efeito da temperatura (170 a 210°C) e da concentração de ácido sulfúrico (0,2 a 1,4% p/p) sobre a hidrólise ácida de poda de oliveira, Cara et al. (2007) verificaram uma recuperação de 83% dos açúcares presentes na fração hemicelulósica, quando empregado 1% de H₂SO₄, em uma temperatura de 170°C por 10 minutos.

2.4. Metabolismo de D-xilose por *Pichia stipitis*

D-xilose é o segundo carboidrato mais abundante na natureza sendo encontrada predominante na fração hemicelulósica de diversos tipos de biomassa vegetal. Em virtude deste fato, a obtenção de etanol de segunda geração dependerá em grande parte da eficiente fermentação desta fração (van VLEET; JEFFRIES, 2009).

O metabolismo de D-xilose apresenta-se de forma distinta entre bactérias e leveduras e até mesmo entre diferentes espécies de leveduras (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008). Normalmente as bactérias degradam a pentose através da enzima xilose-isomerase que é capaz de converter D-xilose em D-xilulose. Posteriormente, a D-xilulose é fosforilada, pela ação da enzima xilulose-quinase, em D-xilulose-5-fosfato, um

intermediário comum no metabolismo de células eucarióticas e procarióticas (MOHAGHEGHI et al., 2002; DIEN et al., 2003; HÄHN-HÄGERDAL et al., 2007).

Dentre as leveduras atualmente estudadas com capacidade de fermentar D-xilose em etanol, destacam-se as dos gêneros *Candida*, *Pichia* (*Scheffersomyces*), *Schizosaccharomyces* e *Pachysolen* (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). De uma forma geral, conforme apresentado na Figura 2.9, a conversão de D-xilose em etanol por leveduras inicia-se com a atuação das enzimas oxirredutases denominadas xilose-redutase (XR) e xilitol-desidrogenase (XDH).

Figura 2.9 - Etapas da fermentação de D-xilose: (A) leveduras em geral e (B) *Pichia stipitis*. (Adaptado de JEFFRIES, 1983).

No interior da célula, D-xilose é convertido em xilitol por ação da XR, sendo esta etapa dependente da coenzima NADH e/ou NADPH. O composto formado pode então ser excretado da célula, ou ainda oxidado em D-xilulose, através da enzima XDH, a qual é

dependente de NAD^+ (SLININGER et al., 1990). Uma vez convertida em D-xilulose, o metabolismo continua com uma reação de fosforilação, catalisada por uma xilulose-quinase, que converte a D-xilulose em D-xilulose-5-fosfato. Este açúcar fosforilado é então metabolizado em intermediários da via glicolítica (gliceraldeído-3-fosfato e D-frutose-6-fosfato) pela via das pentoses fosfato, sendo em seguida convertidos em piruvato pela via *Embden Meyerhof Parnas* (EMP) ou *Entner Doudoroff* (ED). O piruvato por sua vez, pode ser oxidado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, recuperando as coenzimas através da cadeia respiratória, ou ser fermentado em etanol, pela ação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase, sendo neste processo, reoxidado o NADH resultante da oxidação do gliceraldeído-3-fosfato (JEFFRIES, 1983).

A levedura *Pichia stipitis* tem sido reportada como uma das espécies naturais mais eficientes para a bioconversão de D-xilose, por apresentar características únicas que permitem minimizar a produção de xilitol, favorecendo desta forma a produção de etanol (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008). Nesta espécie de levedura, a enzima xilose-redutase apresenta afinidade tanto pelo cofator NADPH quanto pelo NADH. Em condições de baixa aeração, o balanço total de cofatores quando NADH é utilizado preferencialmente em relação ao NADPH permite a produção de etanol em detrimento do xilitol (Figura 2.9-B). Além disso, esta levedura apresenta um sistema respiratório oxidativo complexo na mitocôndria, o qual possui duas vias diferentes de transporte de elétrons, a cadeia tradicional de transporte via citocromo-C e uma via alternativa que utiliza o ácido salicílico, proporcionando um maior controle do potencial redox (JEFFRIES, 1983; JEPSSON; ALEXANDER; HAHN-HAGERDAL, 1995).

Com base no esquema da Figura 2.9, a conversão de D-xilose em etanol pode ser representada pela Equação 2.1, a qual assume que cada molécula de D-xilose é convertida em D-xilulose sem acúmulo de xilitol e que a D-xilulose-5-fosfato é convertida em D-frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato sem reciclo oxidativo ou desequilíbrios de cofatores. Sendo assim, a D-frutose-6-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato são convertidos em etanol via EMP, sem perda de acetato para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e, ainda, que a biossíntese é desconsiderada. O rendimento teórico é então de $1,67 \text{ mol}_{\text{etanol}}/\text{mol}_{\text{D-xilose}}$, ou $0,51 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{D-xilose}}$ (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007).

2.4.1. Fatores que afetam a fermentabilidade de D-xilose por *Pichia stipitis*

O desempenho fermentativo de *Pichia stipitis* tem sido amplamente avaliado em meio semissintético e em hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal. A melhor fermentabilidade destes meios irão depender das condições empregadas, tais como a temperatura, pH, aeração, concentração inicial de substrato e suplementação, bem como da cepa avaliada (SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2010). A Tabela 2.4 apresenta diversos estudos conduzidos com a finalidade de melhorar o processo de produção biotecnológica de etanol a partir de D-xilose.

O suplemento de oxigênio é um dos mais importantes fatores ambientais na fermentação de D-xilose por *Pichia stipitis*, podendo afetar drasticamente o rendimento e a produtividade volumétrica em etanol, bem como o acúmulo de subprodutos, como o xilitol. De acordo com Bruinenberg et al. (1984), a fermentação de D-xilose é mais eficiente quando cultivada a levedura em condições limitadas de oxigênio.

O efeito da oxigenação em cultivo de *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 em meio a base de D-xilose foi investigado por Silva et al. (2012). Os autores verificaram que os maiores valores de $Y_{P/S}$ foram encontrados para baixos valores de K_{La} (0,7 a 12,1 h⁻¹), enquanto valores de K_{La} mais elevados (58,0 a 65,8 h⁻¹) proporcionaram maiores valores de $Y_{X/S}$. Os valores mais elevados de Q_P não foram encontrados nos extremos de transferência de oxigênio, mas nos valores intermédios (K_{La} 4,9 a 18,7 h⁻¹).

Avaliando a influência da aeração ($V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$: 2,5 a 5,0) e agitação (100 a 200 rpm) sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, Silva, Mussatto e Roberto (2010) verificaram que os melhores resultados de produção de etanol ($Y_{P/S} = 0,37$ g/g e $Q_P = 0,39$ g/L.h) foram alcançados quando empregadas os níveis de menor aeração e maior agitação. De acordo com os autores, o estabelecimento de condições adequadas de aeração é de grande relevância para melhorar a produção de etanol a partir de D-xilose por *Pichia stipitis*, utilizando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz como meio de fermentação.

Tabela 2.4 - Efeito das condições de cultivo em meio semissintético e em hidrolisados hemicelulósicos sobre o crescimento e produção de etanol por diferentes cepas de *Pichia stipitis*

Cepas	Condições de cultivo				Concentração (g/L)		Parâmetros Fermentativos			Referência
	Meio de Fermentação	T (°C)	pH	K _L a (h ⁻¹)	D-xilose	Etanol Máximo	Y _{X/S} (g/g)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)	
CBS 5773	Semissintético	30	5,0	-	36	14,0	0,18	0,38	0,58	a
		30	5,0	-	53	20,0	0,10	0,38	0,55	a
		30	5,0	-	76	28,0	0,09	0,36	0,68	a
		30	5,0	-	99	33	0,07	0,38	0,46	a
		30	5,0	-	145	30	0,07	0,27	0,37	a
	Hidrolisado hemicelulósico de resíduo de madeira	30	6,0	-	50	15,3	0,02	0,32	0,32	b
NRRL Y-7124	Semissintético	30	NI	4,9	90*	27,0	0,15	0,32	0,32	c
		30	NI	18,7	90*	13,7	0,21	0,23	0,38	c
		30	NI	65,8	90*	0,0	0,54	0	0	c
		25	4,5	9,9	150	55,0	NI	NI	NI	d
		25	5,5	9,9	150	55,0	NI	NI	NI	d
		25	7,5	9,9	150	42,0	NI	NI	NI	d
		30	5,0	-	30	12,3	NI	0,37	NI	e
		30	5,0	-	90	29,1	NI	0,33	NI	e
		30	5,0	-	170	26,4	NI	0,26	NI	e
	Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz	30	5,5	-	50**	NI	0,12	0,37	0,39	f
		30	5,5	-	66	0,0	0	0	0	f
		30	5,5	-	47	16,0	0,05	0,47	0,34	f
		30	5,5	-	32	14,0	0,06	0,38	0,29	f

(continua)

(continuação)

Tabela 2.4 – Efeito das condições de cultivo em meio semissintético e em hidrolisados hemicelulósicos sobre o crescimento e produção de etanol por diferentes cepas de *Pichia stipitis*

Cepas	Condições de cultivo				Concentração (g/L)		Parâmetros Fermentativos			Referência
	Meio de Fermentação	T (°C)	pH	K _{La} (h ⁻¹)	D-xilose	Etanol Máximo	Y _{X/S} (g/g)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)	
CSIR-Y633	Semissintético	30	5,5	-	50	NI	NI	0,41	0,68	g
		30	6,5	-	50	NI	NI	0,39	0,45	g
		25	4,0	-	50	NI	NI	0,41	0,78	g
		28	4,0	-	50	NI	NI	0,41	0,80	g
		30	4,0	-	50	NI	NI	0,41	0,95	g
		36	4,0	-	50	NI	NI	0,10	0,05	g
NRRL Y-124	Semissintético	30	6,0	-	48	16,3	NI	0,35	0,12	h
	Hidrolisado hemicelulósico de casca de girassol	30	5,5	-	48	9,7	NI	0,24	0,07	h
		30	6,0	-	48	11,0	NI	0,32	0,07	h
		30	7,0	-	48	10,8	NI	0,33	0,08	h
		30	6,0	2,78	48	8,5	NI	0,28	0,06	h
		30	6,0	3,97	48	11,0	NI	0,32	0,07	h
		30	6,0	5,16	48	9,0	NI	0,26	0,08	h

(continua)

(conclusão)

Tabela 2.4 - Efeito das condições de cultivo em meio semissintético e em hidrolisados hemicelulósicos sobre o crescimento e produção de etanol por diferentes cepas de *Pichia stipitis*

Cepas	Condições de cultivo				Concentração (g/L)		Parâmetros Fermentativos			Referência
	Meio de Fermentação	T (°C)	pH	K _{La} (h ⁻¹)	D-xilose	Etanol Máximo	Y _{X/S} (g/g)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)	
CBS 6054	Semissintético	30	6,0	-	40	17,2	NI	0,43	0,61	i
	Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz	30	6,0	-	32***	20,8	NI	0,45	0,35	i

T (temperatura); K_{La} (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio); Y_{X/S} (conversão de substrato em células); Y_{P/S} (conversão de substrato em etanol); Q_P (produtividade volumétrica em etanol). NI (Não informado).

*Acrescido: 15 g/L D-glicose e L-arabinose

**Acrescido: 7,5 g/L D-glicose e 8,5 g/L L-arabinose

***Acrescido: 16 g/L D-glicose

^a GROOTJEN; VAN DER LANS; LUYBEN, 1990; ^b SILVA et al., 2011; ^c SILVA et al., 2012; ^d SLININGER et al., 1990; ^e LEE et al., 2000; ^f SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2010; ^g DU PREEZ; BOSH; PRIOR, 1986; ^h TELLI-OKUR; EKEN-SARAÇOGLU, 2008; ⁱ CHEN et al., 2012..

De acordo com a literatura, a temperatura ótima para a produção de etanol por *Pichia stipitis* em meio semissintético encontram-se entre 25 a 33°C (DU PREEZ; BOSH; PRIOR, 1986; SLININGER; BOTHAST, 1990). Avaliando o efeito da temperatura na fermentação de 50 g/L de D-xilose por *Pichia stipitis* CSIR-Y633, du Preez, Bosh e Prior (1986) constataram que o aumento da temperatura para 36°C afetou negativamente a conversão de substrato em etanol, apresentando uma queda de 25% neste parâmetro quando comparado com os ensaios realizados dentro da faixa ótima de temperatura observada para a levedura avaliada.

O efeito do pH sobre a fermentabilidade de diferentes meios por *Pichia stipitis*, incluindo hidrolisados hemicelulósicos, também tem sido amplamente estudado de forma a maximizar a produção de etanol pela levedura. Du Preez, Bosh e Prior (1986) reportaram que os parâmetros fermentativos obtidos durante o cultivo de *Pichia stipitis* CSIR-Y633 em meio semissintético contendo 50 g/L de D-xilose foi fortemente afetado pelo pH inicial do meio (entre 2,5 e 6,5). Os valores mais elevados de produtividade volumétrica em etanol foram favorecidos na faixa de pH entre 4,0 e 5,5, com uma queda de 12% no parâmetro quando cultivada a levedura em pH inicial de 6,5.

O cultivo da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisados hemicelulósicos tem apresentado melhores resultados nos parâmetros fermentativos em valores de pH mais elevados, em relação a faixa ótima de 25 a 33°C (TELLI-OKUR; EKEN-SARAÇOGLU, 2008). Telli-Okur e Eken-Saraçoglu (2008) reportaram que o fator de conversão de substrato em etanol quando cultivada *Pichia stipitis* NRRL Y-124 em hidrolisado hemicelulósico de casca de girassol foi mais fortemente afetada do que a produtividade volumétrica em etanol, quando cultivada a levedura em diferente valores de pH inicial. Os autores verificaram um aumento de aproximadamente 40% no valor de $Y_{P/S}$ ao elevar o pH inicial do hidrolisado de 5,5 para 6,0, porém, a produtividade em etanol apresentou um aumento de apenas 12%. De acordo com a literatura, a concentração dos ácidos alifáticos fracos não dissociados (forma tóxica) presentes nestes hidrolisados é inteiramente dependente do pH inicial do meio, uma vez que estes compostos podem facilmente difundir para o interior da célula através da membrana plasmática, inibindo assim o crescimento e produção de etanol pela levedura. Desta forma, o efeito inibitório dos ácidos alifáticos na fermentação de hidrolisados hemicelulósicos pode ser minimizado através da manutenção do pH (LOHMEIER-VOGEL; SOPHER; LEE, 1998).

Um importante aspecto ainda a ser considerado na produção de etanol a partir de D-xilose é o efeito da concentração inicial do substrato e dos nutrientes nestes meios fermentativos. Silva et al. (2012) avaliaram através de um planejamento fatorial a influência da composição nutricional (extrato de levedura, uréia e sulfato de magnésio) sobre a fermentação do meio semissintético a base de D-xilose (90 g/L) por *Pichia stipitis* NRRL-Y-7124. Os autores verificaram que os maiores valores de $Y_{P/S}$ (0,40 g/g) foram obtidos para os ensaios em que foi empregado o extrato de levedura em seu nível máximo (3,0 g/L). Por outro lado, o maior valor observado para a produtividade volumétrica em etanol (0,50 g/L.h) foi verificado no ensaio contendo todos os nutrientes nas concentrações máximas avaliadas, o que sugere que a rápida produção de etanol é favorecida positivamente na presença destes nutrientes.

Em geral, fontes de nitrogênio e sais minerais têm sido utilizadas na suplementação de hidrolisados hemicelulósicos visando melhorar a fermentabilidade destes meios (EKEN-SARAÇOGLU; ARSLAN, 2000; SILVA, 2007). Silva (2007) avaliou a influência da suplementação nutricional com uréia, $MgSO_4$ e extrato de levedura em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na fermentação alcoólica por *Pichia stipitis* Y-7124. O estudo mostrou que os melhores resultados dos parâmetros fermentativos foram obtidos em meio suplementado apenas com 3,0 g/L de extrato de levedura, com um aumento na produtividade volumétrica em etanol de 14%, quando comparado com o meio suplementado com uréia (2,3 g/L), $MgSO_4$ (1,0 g/L) e extrato de levedura (3,0 g/L).

A bioconversão de D-xilose em etanol por *Pichia stipitis* também é influenciada pela concentração inicial de substrato do meio fermentativo. Roberto et al. (1991), estudando a produção de etanol por *Pichia stipitis* CBS 5773 a partir de meio semissintético contendo diferentes concentrações de D-xilose (20 a 145 g/L), observaram que a produção do álcool não foi afetada ($Y_{P/S} = 0,38$ g/g) em concentrações inferiores a 145 g/L. Entretanto, quando cultivada a levedura em meio contendo 145 g/L de D-xilose, os autores observaram uma redução na conversão de substrato em etanol de aproximadamente 30%, mostrando que a partir de concentrações muito elevadas deste açúcar pode ocorrer redução da concentração final de produto, bem como do fator de conversão do açúcar em etanol.

A concentração inicial de D-xilose também tem sido avaliada em hidrolisados hemicelulósicos, uma vez que, a viabilidade econômica na etapa de destilação do etanol só é possível se concentrações superiores a 40 g/L do álcool forem alcançadas, tornando assim, imprescindível o emprego de altas concentrações de açúcares fermentescíveis

(GÍRIO et al., 2010). Silva et al. (2010) estudando a fermentação de diferentes concentrações iniciais de D-xilose em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (32 a 88 g/L) por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, observaram que os melhores resultados foram alcançados a partir de 47 g/L da pentose ($Y_{P/S} = 0,47$ g/g e $Q_P = 0,34$ g/L.h), e que a partir de concentrações superiores (66 a 88 g/L), a levedura não foi capaz de produzir etanol. Os autores sugerem que, sob estas condições, o metabolismo da levedura foi inibido pela presença de outros compostos potencialmente tóxicos contidos neste meio.

De fato, além dos parâmetros ambientais e nutricionais acima citados, outros fatores podem afetar a bioconversão de D-xilose em etanol por *Pichia stipitis*, quando cultivada a levedura em hidrolisados hemicelulósicos. Estes fatores estão diretamente ligados com a complexidade química destes hidrolisados, incluindo os compostos potencialmente tóxicos ao metabolismo fermentativo, os quais são liberados durante o processo de hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos, tais como os ácidos alifáticos, furanos e compostos fenólicos de baixa massa molar (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

2.5. Principais compostos tóxicos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos

O tipo de biomassa vegetal, assim como as condições reacionais empregadas durante hidrólise ácida destes materiais, irá determinar a toxicidade do hidrolisado hemicelulósico. Além dos monossacarídeos, vários compostos potencialmente tóxicos ao metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* são gerados, incluindo alguns produtos de degradação de açúcares (furfural e 5-hidroximetilfurfural - 5-HMF), compostos fenólicos derivados da degradação da lignina e ácido acético, proveniente da estrutura hemicelulósica destes materiais (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

A Tabela 2.5 apresenta os teores dos principais compostos tóxicos gerados após hidrólise ácida de diferentes matérias-primas lignocelulósicas e as condições reacionais empregadas na obtenção dos respectivos hidrolisados hemicelulósicos.

Roberto, Mussatto e Rodrigues (2003) verificaram que os níveis de furanos formados durante a hidrólise ácida da palha de arroz foram dependentes da concentração de ácido sulfúrico e tempo de reação, quando mantida constante a temperatura (121°C). Os autores verificaram um decréscimo de 84% nos teores de furfural e 5-HMF, quando diminuída a concentração de ácido e o tempo reacional, de 1,6 para 1,0% e de 30 para 10 minutos, respectivamente.

Tabela 2.5 – Concentração dos principais compostos tóxicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos obtidos sob diferentes condições de hidrólise ácida

Matéria-prima	Condições de hidrólise	Compostos Tóxicos (g/L)					
		Ácido Acético	5-HMF	Furfural	Vanilina	Ácido Ferúlico	Siringaldeído
Palha de arroz	1% H ₂ SO ₄ , 120°C, 30 min ^a	1,50	0,05	0,13	0,05	0,07	0,29
	1% H ₂ SO ₄ , 130°C, 20 min ^b	1,24	0,10	0,12	ND	ND	ND
	3% H ₂ SO ₄ , 160°C, 30 min ^c	2,90	ND	0,15	ND	ND	ND
Poda de oliveira	1% H ₂ SO ₄ , 190°C, 10 min ^d	6,81	ND	3,42	ND	ND	ND
	2% H ₂ SO ₄ , 120°C, 90 min ^e	1,67	0,22	0,04	ND	ND	ND
	0,5% H ₂ SO ₄ , 100°C, 60 min ^f	3,00	0,02	0,01	ND	ND	ND
	0,5% H ₂ SO ₄ , 100°C, 180 min ^f	3,63	0,05	0,11	ND	ND	ND
	1,0% H ₂ SO ₄ , 100°C, 180 min ^f	3,53	0,06	0,13	ND	ND	ND
Palha de trigo	1,85% H ₂ SO ₄ , 90°C, 1080 min ^g	2,70	ND	0,15	ND	ND	ND
Bagaço de cana-de-açúcar	1% H ₂ SO ₄ , 121°C, 10 min ^h	1,13	< 0,01	< 0,01	ND	0,08	0,27
	2% H ₂ SO ₄ , 150°C, 30 min ⁱ	2,70	0,04	0,30	ND	ND	ND
	4% H ₂ SO ₄ , 100°C, 300 min ^j	3,66	ND	1,27	ND	ND	ND
	6% H ₂ SO ₄ , 100°C, 300 min ^k	3,79	ND	0,77	ND	ND	ND
Sabugo de milho	1% H ₂ SO ₄ , 121°C, 90 min ^l	6,30	ND	0,32	ND	ND	ND

^aSILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2010; ^bBAEL; KWON, 2007; ^cCHEN et al., 2012; ^dDÍAZ et al., 2009; ^eMATEO et al., 2013; ^fPUENTES et al., 2013; ^gNIGAM, 2001;

^hFONSECA et al., 2011; ⁱCANILHA et al., 2010; ^{j,k}AGUILAR et al., 2002; ^lGE et al., 2011.

O efeito da temperatura (100 a 128°C), tempo de reação (0 a 300 minutos) e concentração de ácido sulfúrico (2 a 6%) sobre a hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar foi avaliado por Aguilar et al. (2002). Os autores verificaram que o aumento na concentração de H_2SO_4 (de 2 para 4 ou 6%) favoreceu em 60% a liberação de ácido acético apenas quando empregado 100°C por 60 minutos. Para as outras temperaturas avaliadas, a concentração de ácido acético atingiu valor máximo após 20 minutos de reação, independente da concentração de H_2SO_4 empregada. Em relação ao furfural, os autores verificaram que todos os fatores avaliados apresentaram efeito sobre a degradação de D-xilose, com a concentração do furano variando de 0,8 a 5,8 g/L.

A Figura 2.10 ilustra de forma resumida o mecanismo de inibição destes compostos sobre o crescimento celular e a produção de etanol por *Pichia stipitis*.

Figura 2.10 - Propostas dos mecanismos de inibição dos furanos, ácidos alifáticos fracos e compostos fenólicos em células de leveduras. ADH (álcool desidrogenase), PDH (piruvato desidrogenase), ALDH (aldeído desidrogenase), HA (ácidos alifáticos fracos). (Modificado de ALMEIDA et al., 2007).

2.5.1. Ácidos alifáticos fracos

Os principais ácidos alifáticos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos são os ácidos acético, fórmico e levulínico (Figura 2.11). O ácido acético é derivado das xilanas acetiladas e os ácidos fórmico e levulínico são formados a partir da degradação dos furanos (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Figura 2.11 - Fórmula estrutural e massa molar dos principais ácidos alifáticos presentes em hidrolisado hemicelulósico de biomassa vegetal.

O efeito inibitório destes ácidos é altamente dependente do valor do pH do meio fermentativo, podendo atuar negativamente no crescimento celular e na produção de etanol. Os valores de pKa a 25°C para os ácidos acético, fórmico e levulínico são de 4,75, 3,75 e 4,66, respectivamente. Em valores de pH inferiores aos respectivos pKas, estes compostos encontram-se principalmente nas formas não-dissociadas. Nesta forma, os ácidos são lipossolúveis podendo assim entrar na célula por difusão simples, através da membrana plasmática, ocorrendo no citoplasma (pH~7,4) a dissociação destes compostos. De acordo com Lohmeier-Vogel, Sopher e Lee (1998), para que as células mantenham o pH intracelular constante, os prótons devem ser transportados através da membrana pela ação do ATPase presente na membrana plasmática. Isto resulta em um aumento do consumo do ATP, causando redução no rendimento de biomassa. Em concentrações mais elevadas de ácido, há uma interferência na capacidade de bombeamento de prótons, acidificando, desta forma o citoplasma, com posterior morte celular.

A presença de ácido acético em meios de fermentação pode afetar negativamente o consumo de açúcares, bem como a produção de etanol e o crescimento celular de *Pichia stipitis*. Díaz et al. (2009) cultivaram a cepa CECT No. 1922 visando a obtenção de etanol a partir de D-glicose (20 g/L) e D-xilose (15 g/L), em meio contendo ácido acético (3,0 a 6,0 g/L) e verificaram consumo completo da hexose após 12 horas de ensaio, quando cultivada a levedura em meio sem o inibidor. No entanto, na presença de 3,0 e 6,0 g/L de ácido acético, o consumo total da hexose foi observado após 24 e 72 horas,

respectivamente. Os autores verificaram também que o ácido afetou o metabolismo fermentativo da levedura, mesmo na menor concentração utilizada, sendo constatado um decréscimo de 45% na produtividade volumétrica em etanol, quando comparado ao ensaio sem a presença do inibidor.

Bellido et al. (2011) avaliaram o efeito da concentração inicial de ácido acético (0,5 a 3,5 g/L) sobre a fermentabilidade de *Pichia stipitis* DSM 3651 em meio semissintético (pH 5,0) contendo 35 g/L de D-glicose e 20 g/L de D-xilose. Nas menores concentrações estudadas, foi verificada uma redução sobre a produtividade volumétrica em etanol inferior a 30%. Entretanto, ao cultivar a levedura em presença de 2,5 g/L do ácido, a queda neste parâmetro atingiu aproximadamente 60%.

O efeito do ácido acético durante o cultivo de *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 em meio semissintético contendo 55 g/L de açúcares totais (D-glicose + D-xilose) e pH inicial de 5,5 foi avaliado por Zeferino (2013). O autor verificou que o fator de conversão de substrato em produto apresentou-se constante, dentro da faixa de 0,30 a 0,38 g/g, independente da concentração de ácido empregada (1,5 a 4,5 g/L). No entanto, em presença de 1,5 g/L do ácido, a produtividade volumétrica em etanol decresceu em 28%, e essa queda foi mais acentuada ao empregar a maior concentração do composto tóxico, com redução de 77%, quando comparados ao meio sem inibidor. O autor verificou ainda, que os açúcares foram mais pobremente consumidos a medida que a concentração de ácido acético foi aumentada no meio, o que poderia estar relacionado com as falhas no transporte dos mesmos para o interior da célula. Segundo Kilian e van Uden (1988), a D-glicose e a D-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 a pentose. A presença de um ácido fraco como, por exemplo, o ácido acético no meio de cultivo pode prejudicar o funcionamento destes sistemas e ocasionar acúmulo de substrato ao final da fermentação.

2.5.2. Furanos

Os furanos são compostos orgânicos heterocíclicos e aromáticos, com baixa solubilidade em água. Em suas estruturas podem ser encontradas diversos grupos funcionais como aldeídos, cetonas, ésteres, álcoois, éteres, ácidos e tióis, e sua aromaticidade vem do fato de que um dos pares eletrônicos do oxigênio interage com as

ligações duplas, gerando uma deslocalização destes elétrons, levando a características semelhantes a do benzeno (SOLOMONS, 2001).

Estes compostos estão presentes em hidrolisados hemicelulósicos em virtude da degradação dos açúcares durante a etapa hidrolítica, podendo encontrar furfural e 5-HMF como produtos da degradação de pentoses e hexoses, respectivamente (Figura 2.12). As concentrações destes aldeídos nos hidrolisados hemicelulósicos podem variar tipicamente entre 0 e 5 g/L para cada composto, dependendo do tipo e das condições de hidrólise ácida empregada na etapa de fracionamento dos materiais lignocelulósicos (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Figura 2.12 - Fórmula estrutural e massa molar dos principais compostos furânicos presentes em hidrolisado hemicelulósico de biomassa vegetal.

Os aldeídos em geral são conhecidos como compostos que possuem atividade antimicrobiana. Vários mecanismos já foram elucidados de forma a explicar o efeito dos furanos sobre o metabolismo microbiano, como, por exemplo, a atuação direta destes compostos a níveis enzimáticos. Estudos mostraram que os furanos podem inibir as enzimas álcool desidrogenase (ADH), piruvato-desidrogenase (PDH) e aldeído-desidrogenase (ALDH), bem como as enzimas glicolíticas como a hexoquinase e a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (BANERJEE; BHATNAGAR; VISWANATHAN, 1981; MODIG; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002).

De acordo com Modig, Lidén e Taherzadeh (2002), ao realizarem um estudo fermentativo *in vitro*, foi verificado que a bioconversão do acetaldeído em etanol foi inibida por ambos os furanos contidos nos hidrolisados hemicelulósicos. Os autores verificaram que o furfural atuou diretamente nas enzimas álcool-desidrogenase e aldeído-desidrogenase, apresentando reduções superiores a 60 e 80% em suas atividades, respectivamente, quando empregado 0,12 g/L do furano.

De acordo com Heer, Heine e Sauer (2009), o estresse químico promovido pela presença destes furanos em meios fermentativos aumenta a duração da fase lag de crescimento celular, sendo dependente do tipo de micro-organismo, bem como de suas

concentrações no meio. A bioconversão de furfural em álcool furfuril por *Saccharomyces cerevisiae* pode resultar na diminuição dos níveis de NADPH, fato que explica o aumento nos teores de acetato excretados ao meio quando em presença deste composto (Figura 2.13).

Figura 2.13 - Efeito do furfural no fluxo metabólico de *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. Os valores são expressos como porcentagem de moles de consumo de D-glicose. PPP (via das fosfopentoses). (Modificado de HEER; HEINE; SAUER, 2009).

O efeito tóxico do furfural sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis* CBS 5773 em meio semissintético contendo 30 g/L de D-xilose foi estudado por Roberto et al. (1991). Os autores observaram que concentrações de furfural acima de 2,0 g/L inibiram completamente o crescimento celular e o consumo do açúcar pela levedura. Entretanto, em concentrações abaixo de 0,5 g/L, o aldeído atuou como fonte de carbono, com efeito positivo na formação de biomassa, sendo verificado também o mesmo consumo de D-xilose quando comparado ao meio sem o composto.

Avaliando a produção de etanol por *Pichia stipitis* DMS 3651 na presença de diferentes concentrações iniciais de furfural, Bellido et al. (2011) 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 volumétrica em etanol. Nestes ensaios foram verificadas concentrações máximas de etanol de aproximadamente 23 g/L, a partir de uma mistura de D-glicose (30 g/L) e D-xilose (20 g/L).

Zeferino (2013) investigou o efeito do furfural sobre o crescimento e a produção de etanol por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 em meio contendo uma mistura de D-glicose e

D-xilose (55 g/L) e verificou que o composto afetou primariamente o crescimento da levedura, e apenas na maior concentração avaliada (84 mg/L) houve impacto sobre a produção de etanol. Nesta condição foi verificado redução na produção máxima de etanol de 16% quando comparado com o controle sem o inibidor. O autor verificou também que os açúcares foram completamente consumidos, independente da concentração de furfural no meio fermentativo. Comportamento diferente foi verificado por Liu et al. (2004) ao estudar o efeito do furfural em concentrações iniciais entre 1,0 e 11,5 g/L sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. Neste trabalho foi observado um atraso no início do consumo da D-glicose, porém, foram empregadas concentrações de furfural superiores às aquelas empregadas por Zeferino (2013).

2.5.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos apresentam grande diversidade de estruturas químicas, incluindo desde moléculas aromáticas simples até moléculas altamente polimerizadas. Estes compostos apresentam como estrutura básica um anel benzênico com um ou mais grupos hidroxilas associados diretamente à cadeia cíclica, podendo também apresentar grupos substituintes, como carboxilas, carbonilas, metoxilas e outras formas cíclicas não-aromáticas. Os ácidos fenólicos, os flavonóides e os taninos são considerados as principais classes destes compostos, além de serem apontados como os fenólicos mais abundantes em cereais e leguminosas (SOLOMONS, 2001; HOUNSOME et al., 2008).

Os compostos fenólicos de baixa massa molar são a classe de inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos com maior variedade estrutural, uma vez que estes são gerados devido a degradação da lignina (Tabela 2.6). Os ácidos fenólicos são estruturas envolvidas na formação da lignina, fato que explica sua abundância em sementes e cascas de frutas, bem como em caules e folhas de vegetais (HOUNSOME et al., 2008; SOUSA, 2009). Dentro desta classe estão os ácidos hidroxicinâmicos (X_a) e hidroxibenzóicos (X_b), e ainda alguns aldeídos análogos (X_c), como a vanilina e o siringaldeído. Os ácidos hidroxibenzóicos são comumente encontrados em plantas superiores e possuem estrutura C_6-C_1 , incluindo os ácidos gálico, vanílico e siríngico, enquanto que os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos ligados a uma cadeia com três átomos de carbono (C_6-C_3), destacando-se os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico (HOUNSOME et al., 2008).

Tabela 2.6 - Formas estruturais dos principais compostos fenólicos de baixa massa molar de ocorrência natural presentes em hidrolisados ácidos hemicelulósicos

Estrutura Base					Substituinte na posição X

Grupos Substituintes					Nome do composto	
R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X		
H	H	H	H	a	Ácido cinâmico	
-OH	H	H	H	a	Ácido <i>o</i> -cumárico	
H	H	-OH	H	a	Ácido <i>p</i> -cumárico	
H	-OH	H	H	a	Ácido <i>m</i> -cumárico	
H	-OCH ₃	-OH	H	a	Ácido ferúlico	
H	-OH	-OH	H	a	Ácido caféico	
H	-OCH ₃	-OH	H	b	Ácido vanílico	
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	b	Ácido siríngico	
-OH	-OH	-OH	-OH	b	Ácido gálico	
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	c	Siringaldeído	
H	-OCH ₃	-OH	H	c	Vanilina	

Fonte: SOUSA, 2009.

Silva, Carneiro e Roberto (2013a) reportaram a presença de vanilina, álcool vanilil, ácido vanílico, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. No entanto, de acordo com Monasterio, Fernández e Silva (2013), o hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira apresenta em sua composição outros componentes fenólicos, tais como o ácido caféico, ácido cinâmico, além de tirosol, hidroxitirosol, ácido elenólico e diversas estruturas polifenólicas, como a oleuropeína, conforma apresentado na Figura 2.14.

Figura 2.14 - Formas estruturais de alguns dos principais compostos fenólicos de ocorrência natural presentes em hidrolisado hemicelulósico proveniente da poda de oliveira.

Klinke, Thomsen e Ahring (2004) reportaram que os compostos fenólicos de baixa massa molar são mais tóxicos para os micro-organismos fermentativos quando comparados aos compostos fenólicos de elevada massa molar. Isto se deve ao fato destes compostos serem mais facilmente difundidos para o interior celular e/ou mais reativos com alguns dos constituintes da membrana plasmática do que os compostos que apresentam massa molar mais elevada.

Outros fatores importantes acerca da toxicidade dos compostos fenólicos são a posição e o tipo dos grupos substituintes presentes no anel aromático. Larsson et al. (2000) ao avaliarem a toxicidade de vanilina, *o*-vanilina e isovanilina sobre a fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae*, verificaram que a posição do grupo substituinte apresentou um efeito negativo mais acentuado no crescimento celular do que o tipo de grupo substituinte. Em seus experimentos, foi demonstrado que a hidroxila na posição *orto* (*o*-vanilina) tornou o aldeído mais tóxico para a levedura do que na posição *para* (vanilina). Entretanto, quando os substituintes metoxila e hidroxila se encontravam

alternados nas posições *meta* e *para*, como na vanilina e isovanilina, nenhum efeito importante na toxicidade dos aldeídos foi observado.

Delgenes, Moletta e Navarro (1996) avaliaram a capacidade de *Saccharomyces cerevisiae* CBS1200 e *Zymomonas mobilis* ATCC10988 em fermentar D-glicose e de *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* ATCC22984 em fermentar D-xilose, quando em presença de siringaldeído, vanilina e *p*-hidroxibenzaldeído. Os resultados mostraram que os micro-organismos responderam de forma diferente a cada aldeído empregado e que o efeito destes compostos sobre os parâmetros fermentativos foi dependente de sua concentração no meio. A levedura *Pichia stipitis*, por exemplo, apresentou uma redução na produção de etanol de aproximadamente 90% quando em presença de 1,5 g/L de *p*-hidroxibenzaldeído ou 1,5 g/L de siringaldeído, e em todas as concentrações de vanilina empregadas (0,5 - 2 g/L).

Zeferino (2013) avaliou o efeito da vanilina, siringaldeído e dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico sobre a fermentação de meio a base de D-glicose e D-xilose por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. Dentre estes compostos, o siringaldeído foi o que causou o maior impacto sobre o metabolismo fermentativo da levedura, 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. Por outro lado, o autor verificou que a vanilina (55 e 175 mg/L), afetou primariamente o crescimento de *Pichia stipitis* nas condições avaliadas (redução de aproximadamente 16% em todos os níveis) e seu impacto negativo sobre a produção de etanol (33%), $Y_{P/S}$ (24%) e Q_P (46%) foi observado apenas no maior teor do composto. Em relação aos ácidos fenólicos, foi observado reduções principalmente no crescimento celular, em um nível proporcional à concentração dos compostos no meio de fermentação. O ácido ferúlico, por exemplo, reduziu o valor de Q_P (35%) em concentrações a partir de 570 mg/L, e o ácido *p*-cumárico diminuiu os valores de Q_P (25%) e $Y_{P/S}$ (37%) em concentrações a partir de 320 mg/L.

2.6. O efeito sinérgico

De acordo com Zalvidar, Martinez e Ingram (1999), a toxicidade dos hidrolisados hemicelulósicos se deve ao efeito sinérgico dos compostos presentes no meio, ou seja, a combinação destes compostos é mais inibitória do que a soma de seus efeitos individuais. De fato, estes autores verificaram um efeito conjunto entre combinações binárias de

furfural (2,0 g/L) com siringaldeído (0,30 g/L), vanilina (0,40 g/L) ou *p*-hidroxibenzaldeído (0,15 g/L) sobre os parâmetros fermentativos em meio a base de D-xilose. Neste trabalho foi constatada inibição superior a 75% no crescimento celular de *Escherichia coli* LY01 para todas as combinações avaliadas, quando cultivada a bactéria a 30°C, pH 7,0 por 24 horas. A inibição sinérgica pela combinação de furfural e vanilina foi mais acentuada em relação às demais combinações avaliadas, atingindo uma redução de aproximadamente 90% no crescimento celular, quando comparado com o controle sem os inibidores. Quando testadas isoladamente, os meios contendo furfural e vanilina apresentaram reduções inferiores a 30% no crescimento da bactéria.

Em outro estudo, Zalvidar, Martinez e Ingram (2000) avaliaram o efeito inibitório da combinação binária de diversos álcoois aromáticos (catecol, furfuril, guaiacol, metilcatecol e vanilil) sobre a fermentação de 50 g/L de D-xilose por *Escherichia coli* LY01. Embora na maioria das combinações avaliadas a redução observada no crescimento da bactéria tenha sido de 40 a 60%, os autores constataram que as combinações com álcool furfuril foram mais tóxicas para a bactéria (inibição de 60 a 80%). No mesmo estudo, os autores verificaram também o efeito combinado do furfural (2,0 g/L) com os álcoois aromáticos. Os resultados mostraram que as combinações do aldeído com álcool furfuril (2,0 g/L) e guaiacol (0,35 g/L) foram as mais tóxicas para o crescimento microbiano, com inibição de 80 e 97%, respectivamente.

Quando cultivada as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 211239 e NRRL Y-12632, e *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 em meio semissintético contendo 25 g/L de D-glicose (25 g/L) em presença de furfural e 5-HMF (individual - 1 a 15 g/L, ou combinados - 1 a 6 g/L), Liu et al. (2004) constataram que estes inibidores agem de forma sinérgica, afetando negativamente o crescimento das leveduras, mesmo em baixas concentrações. Estes autores verificaram ainda, que o furfural apresentou-se como um composto mais inibitório do que o 5-HMF, e que seus respectivos álcoois foram menos tóxicos para as leveduras avaliadas.

Díaz et al. (2009) observaram que o ácido acético na concentração de 3,0 g/L, quando em combinações binárias com furfural ou ácido fórmico, produziu inibição total do crescimento de *Pichia stipitis* CECT No. 1922. Os autores atribuíram este evento ao efeito sinérgico de inibição entre os compostos, pois o crescimento celular havia sido detectado mesmo na presença de 6,0 g/L de ácido acético, quando empregado o composto individualmente.

Pereira, Mussatto e Roberto (2011) avaliaram o efeito da combinação de ácido acético (2,6 g/L), ácido ferúlico (0,6 g/L) e siringaldeído (0,8 g/L) sobre a fermentação de 15 g/L de D-glicose e 80 g/L de D-xilose (pH 5,5) por *Candida guilliermondii* ATCC 201935. Os resultados mostraram uma redução de 26% na produtividade volumétrica em xilitol quando cultivada a levedura em meio contendo todos os compostos tóxicos. No entanto, não foi verificada diferença no valor deste parâmetro quando empregado apenas os compostos fenólicos, em relação ao ensaio sem inibidores. Os autores concluíram que a completa remoção destes compostos no meio de fermentação não é necessária para obter uma produtividade volumétrica eficiente em cultivos de *Candida guilliermondii* e que a inibição causada pelo ácido acético poderia ser controlada pelo tamponamento do meio de fermentação.

2.7. Métodos de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos

Para contornar os problemas de inibição em hidrolisados ácidos hemicelulósicos, diversas estratégias de tratamento (química, física e/ou biológica) têm sido estudadas, com a finalidade de remover e/ou reduzir a concentração dos compostos tóxicos presentes nestes licores hemicelulósicos, melhorando assim a fermentabilidade destes meios.

2.7.1. Métodos químicos

Os métodos químicos de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos são baseados em modificações químicas dos compostos inibidores presentes nestes meios, através da adição de substâncias com capacidade redutora ou em processos que envolvem alteração de pH (PARAJÓ et al., 1998; MILLATI et al., 2002; CHENG et al., 2007).

O método de destoxificação química mais reportado na literatura baseia-se na precipitação de alguns compostos tóxicos e na instabilidade destes compostos em determinado valor de pH. Estudos revelam que esta técnica tem sido capaz de reduzir parcialmente as concentrações dos ácidos alifáticos, compostos derivados da lignina e furanos (HUANG et al., 2008; DÍAZ et al., 2009; MATEO et al., 2013). Entretanto, apresenta a desvantagem de perdas de volume de hidrolisado, bem como da concentração de açúcares, devido à decomposição destes carboidratos quando presentes em solução alcalina (CHENG et al., 2007; GE et al., 2011; DÍAZ et al., 2009).

Millati, Niklasson e Taherzadeh (2002) estudaram a variação de pH (10 a 12), tempo de reação (0 a 170 horas) e temperatura (25 e 60°C) sobre a destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de madeira. Os autores verificaram que independente da temperatura empregada, as maiores remoções de furanos (> 90%) foram obtidas quando elevado o pH até 12 com adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ com um tempo de tratamento de 20 horas. Entretanto, nestas condições foi verificada uma perda acentuada nas concentrações de D-glicose (32%) e D-xilose (74%). Ge et al. (2011) também verificaram perda nos teores de açúcares em hidrolisado hemicelulósico de espiga de milho utilizando CaO para elevar o pH do meio até 7,0. Nestas condições de tratamento foram verificadas perdas de 14 e 8% nas concentrações de D-xilose e D-glicose, respectivamente, assim como nas concentrações de furfural (99%), ácido acético (51%) e compostos fenólicos (16%). Ao fermentar o hidrolisado destoxificado com *Candida shehatae* ACCC 20335, os autores observaram um aumento de 81% na produtividade volumétrica em etanol quando comparado com o hidrolisado não-tratado.

Mateo et al. (2013) verificaram perda de açúcares (35% D-glicose e 31% D-xilose) e de volume (20%) ao destoxificarem hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira empregando CaO para elevar o pH até 10. De acordo com os autores, a perda de volume de hidrolisado está associada possivelmente à precipitação dos sais de cálcio. Nestas mesmas condições foi verificada perda de 32, 56 e 62% de ácido acético, furanos e compostos fenólicos, respectivamente. Entretanto, os autores não avaliaram a fermentabilidade do meio após processo de destoxificação.

Outro método químico atualmente estudado para destoxificar hidrolisado hemicelulósico é a aplicação de processos oxidativos avançados, os quais podem ser definidos como aqueles em que os radicais hidroxilas são produzidos para atuarem como agentes oxidantes, sendo capazes de mineralizar compostos orgânicos biorrecalcitrantes ou convertê-los em compostos biodegradáveis. Silva, Carneiro e Roberto (2013a,b) ao empregarem ozônio em meio alcalino (pH 8,0) na presença de peróxido de hidrogênio para destoxificar hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, verificaram redução de 95 e 52% nas concentrações dos compostos fenólicos e furânicos, respectivamente. Ao fermentarem o meio tratado, os autores verificaram que a produtividade volumétrica em etanol por *Pichia stipitis* foi aumentada em aproximadamente duas vezes em relação ao hidrolisado não-tratado, com concentração final do álcool de aproximadamente 26 g/L após 72 horas de ensaio fermentativo.

2.7.2. Métodos físicos

Os métodos físicos de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos baseiam-se na remoção dos compostos tóxicos seja por adsorção, como os que utilizam carvão ativado (MUSSATTO; ROBERTO, 2001; CHANDEL et al., 2007) e resinas de troca iônica (DELER et al., 2000; CARVALHO et al., 2004), seja por processos de transferência de fase, como a extração dos compostos tóxicos por solventes orgânicos (MATEO et al., 2013), seja pela evaporação dos referidos compostos (CONVERTI et al., 2000).

O método de destoxificação empregando carvão ativado baseia-se na capacidade deste material poroso, de origem natural, de adsorver diferentes tipos de moléculas, as quais são retidas na superfície do carvão através de interações eletrostáticas ou por ação de força de *van der Waals*. Esta metodologia de destoxificação de hidrolisado hemicelulósico tem sido reportada em diversos trabalhos pela sua eficácia na remoção de furanos e compostos fenólicos, levando a melhores resultados nos subsequentes processos fermentativos (MUSSATTO; ROBERTO, 2001; CHANDEL et al., 2007). De acordo com Mussatto, Santos e Roberto (2004), a porosidade dos carvões ativados é um dos aspectos mais importantes para a avaliação de seu desempenho, já que a estrutura dos poros deste material está relacionada com suas características de adsorção.

A fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida shehatae* NCIM 3501 após tratamento com carvão ativado foi avaliada por Chandel et al. (2007). Os autores observaram que a produtividade volumétrica em etanol quando cultivada a levedura em hidrolisado tratado aumentou em 53% quando comparada com a do hidrolisado não-tratado, verificando-se também, na etapa de destoxificação, redução na concentração de compostos fenólicos (57%) e furanos (38%).

Díaz et al. (2009) avaliaram o emprego de carvão ativado no tratamento de hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira para a bioprodução de etanol por *Pichia stipitis* CECT No.1922 e observaram uma remoção de 83% na concentração de furfural. Consequentemente, foi verificada uma melhora no fator de conversão de D-xilose em etanol e na produtividade volumétrica do processo, com valores de 0,35 g/g e 0,17 g/L.h, respectivamente, uma vez que não foi verificado fermentabilidade do hidrolisado não-tratado.

Uma das desvantagens do uso de carvão ativado como agente de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos é a remoção considerável de açúcares fermentescíveis

presentes nestes meios, o que pode atingir níveis elevados de até 30% (LEE et al., 2011). Empregando essa metodologia para destoxificar o hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, Villarreal et al. (2006) verificaram um decréscimo de aproximadamente 25% na concentração de D-glicose presente no hidrolisado, concomitantemente a uma redução superior a 80% na concentração de compostos fenólicos e furanos.

O uso de resinas de troca iônica no tratamento de hidrolisados hemicelulósicos tem sido também muito estudado como método de destoxificação. Estas resinas poliméricas são formadas por uma estrutura tridimensional na qual os grupos funcionais encontram-se presos por meio de ligações covalentes. A característica adsorvente destes materiais se dá devido às interações eletrostáticas entre o adsorvente (que possui uma determinada carga elétrica) e uma molécula com carga oposta. Este tratamento é capaz de remover eficientemente a cor do hidrolisado, compostos fenólicos, ácidos orgânicos e inorgânicos, compostos furânicos e íons metálicos. Entretanto, as perdas de açúcares podem chegar a até 40% (CARVALHO et al., 2004; VILLARREAL et al., 2006).

Carvalho et al. (2006) avaliaram o processo de destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto por diferentes metodologias, incluindo a adsorção em carvão ativado e resina de troca iônica. A combinação destes dois métodos de destoxificação promoveu a remoção de ácido acético (49%), furfural (100%), 5-HMF (93%) e compostos fenólicos totais (69%), porém, foi verificado também uma redução na concentração de D-xilose e D-glicose de aproximadamente 30%. Neste trabalho, os autores não avaliaram a fermentabilidade do meio após os diferentes processos de destoxificação. Perdas de açúcares também foram observadas por Villarreal et al. (2006) durante tratamento do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto com resina de troca iônica para posterior bioprodução de xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037. Neste trabalho, os autores observaram uma redução na concentração de D-glicose de 43%, com concomitante remoção de ácido acético, furfural, 5-HMF e compostos fenólicos (> 90%). Como consequência do tratamento, foi verificado um aumento de 78% no fator de conversão de substrato em produto e uma produção de 32,7 g/L de xilitol, enquanto que para o hidrolisado não-tratado a concentração do produto não ultrapassou a 1,2 g/L.

A extração com solventes orgânicos tem sido empregada em diferentes tipos de hidrolisados hemicelulósicos com vistas a remover furanos, ácido acético e compostos derivados da lignina. Esta metodologia baseia-se no uso de solventes orgânicos imiscíveis em água, tais como tricloroetileno, benzeno, etilacetato, éter dietílico, hexano, octanol e clorofórmio, de forma a promover a transferência dos compostos tóxicos presentes nos

hidrolisados hemicelulósicos (fase aquosa) para a fase orgânica (solvente) (LOGSDAIL; SLATER, 1993).

De acordo com Delgenes, Moletta e Navarro (1990), o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo empregando extração com éter para posterior fermentação do meio por *Pichia stipitis* Y7124, foi capaz de remover furfural (100%) e ácido acético (15%). Neste estudo foi verificada uma melhora de 30% no fator de conversão de substrato em produto. Empregando três diferentes tipos de solventes orgânicos (clorofórmio, hexano e acetato de etila) para destoxificar o hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira, Mateo et al. (2013) verificaram que o acetato de etila foi o solvente mais eficaz na remoção de furanos (94 e 40% para o furfural e 5-HMF, respectivamente), bem como para os compostos fenólicos de baixa massa molar (49%). Os autores não verificaram a fermentabilidade do meio após os diferentes tratamentos empregados.

2.7.3. Métodos biológicos

Os chamados métodos biológicos de destoxificação de hidrolisados lignocelulósicos são aqueles que empregam micro-organismos e/ou enzimas com capacidades de promover modificações na estrutura química dos compostos inibidores, resultando em substâncias de menor toxicidade (OKUDA et al., 2008; WIERCKX et al., 2010). Uma das vantagens deste método é que, dependendo do sistema biológico empregado, pode-se contornar a perda de açúcares presentes nos hidrolisados. Além disso, os métodos biológicos apresentam outras vantagens em relação aos métodos físicos e químicos de destoxificação de hidrolisados como condições reacionais mais brandas, ausência de produtos químicos tóxicos e corrosivos, bem como menor demanda de energia (LIU, 2011; MORENO et al., 2013).

Vários métodos biológicos podem ser utilizados para diminuir os efeitos inibitórios dos compostos aromáticos na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos. As possíveis opções incluem a utilização de enzimas, como as lacases, ou suspensões celulares através da metabolização e/ou biotransformação destes compostos (LIU et al., 2004; WIERCKX et al., 2010; MORENO et al., 2013). No entanto, é importante ressaltar, que não foi encontrada na literatura estudos de destoxificação biológica em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de poda de oliveira, bem como a fermentação destes meios por *Pichia stipitis*, após processo de biotratamento.

Na polimerização oxidativa as enzimas oxidam os compostos fenólicos para formarem radicais aromáticos que, por sua vez, combinam-se entre si para formarem estruturas poliméricas que se precipitam espontaneamente em solução, devido à sua baixa solubilidade (Figura 2.15). Para tal finalidade, é necessária a presença de mediadores, os quais podem desenvolver um mecanismo de oxidação não disponível à enzima, alargando assim a oxidação a uma série de substratos inacessíveis a estas enzimas (FABBRINI; GALLI; GENTILI, 2002). Por exemplo, as lacases são enzimas da classe de oxirredutases, capazes de catalisar a transformação de vários compostos aromáticos, conferindo a esses derivados fenólicos menores solubilidades e maiores estabilidades quando comparado aos compostos de origem (JÖNSSON et al., 1998; MAYER; STAPLES, 2002).

Figura 2.15 – Mecanismo químico proposto para a obtenção do poli(catecol) catalisado por lacase (AKTAS; TANYOLAC, 2003).

De acordo com Moreno et al. (2012), a melhor atuação oxidativa da lacase irá depender do tipo de composto fenólico avaliado. Por exemplo, a enzima apresenta menor susceptibilidade a oxidação enzimática para a vanilina em relação ao siringaldeído. O efeito doador de elétrons do substituinte metoxila ligado ao anel benzênico reforça a atividade da lacase devido a uma diminuição do potencial redox. Desta forma, a vanilina, que apresenta apenas uma metoxila, é lentamente oxidada por lacase quando comparado ao siringaldeído, o qual apresenta dois grupos metoxilas ligados ao anel benzênico. Além disso, a enzima apresenta maior atividade em ácidos *p*-hidroxicinâmicos do que em compostos fenólicos mais simples, como a vanilina e o siringaldeído, devido ao sistema de dupla ligação conjugada presentes nestes ácidos, o que facilita a captação de elétrons.

Para destoxificar hidrolisado celulósico de salgueiro pré-tratado com vapor e SO₂, Jönsson et al. (1998) empregaram a enzima lacase extraída do fungo *Trametes versicolor*. O tratamento enzimático conduziu a uma redução na concentração de diversos monômeros fenólicos, incluindo a vanilina (98%), catecol (75%) e guaiacol (97%), o que resultou em

um aumento no consumo de D-glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante etapa fermentativa. Segundo os autores, foi verificado um aumento de aproximadamente 230% na produtividade volumétrica em etanol e no consumo de D-glicose pela levedura, quando comparado ao hidrolisado não-tratado.

Moreno et al. (2012) verificaram que o tratamento com lacase do *slurry* de palha de milho (consistência de 5% p/v) obtido por explosão a vapor, foi capaz de reduzir em 100% a concentração de siringaldeído, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico, e de 71% de vanilina. Neste trabalho foi verificado uma produtividade volumétrica em etanol de 0,89 g/L.h quando fermentado o meio tratado por *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, o que representou uma melhora de 89% no parâmetro fermentativo em relação ao controle não-tratado. Em relação ao fator de conversão de substrato em produto, neste estudo não foi observado diferença no parâmetro após o biotratamento do hidrolisado.

O estudo do metabolismo microbiano de aldeídos aromáticos (fenólicos e furanos) tem permitido uma nova possibilidade de destoxificação de hidrolisados lignocelulósicos. O tratamento de hidrolisados empregando suspensão celular apresenta como principal vantagem o fato de que as enzimas e os cofatores envolvidos na reação de interesse se encontram em seu ambiente natural, o que faz com que permaneçam ativos e estáveis durante todo o processo catalítico (CÁNOVAS; TORROGLOSA; IBORRA, 2005; ABRAHAM; BHAT, 2008). O aspecto fundamental deste processo biológico é o emprego de micro-organismos que apresentam a capacidade de metabolizar eficientemente os compostos inibidores presentes nestes hidrolisados ou de convertê-los em substâncias com menor grau de toxicidade (NICHOLS; DIEN; COTTA, 2010; LIU, 2011).

De acordo com Doten et al. (1987), em alguns micro-organismos o metabolismo dos compostos fenólicos pode ser dividido em dois estágios:

- Oxidação do anel benzênico formando cis-diidrodiol;
- Rearomatização do cis-diidrodiol formando um dos derivados diidroxilados (catecol, ácido protocatecóico ou ácido gentístico).

Na etapa de oxidação, a molécula de oxigênio é incorporada ao anel benzênico formando cis-diidrodiol, sendo catalisada por enzimas do grupo oxigenases. Embora os passos iniciais da rearomatização do cis-diidrodiol, realizada por uma desidrogenase, sejam

semelhantes para muitos compostos aromáticos, o número de intermediários formados após esta etapa é limitado (DOTEN et al., 1987).

A Figura 2.16 apresenta resumidamente as vias de metabolização dos compostos fenólicos após a formação dos três possíveis intermediários dihidroxilados, levando à formação de intermediários do ciclo de Krebs. Esses intermediários hidroxilados atuam como substratos para outros tipos de dioxigenases não requerentes de cofatores, que promoverão a clivagem do composto através de duas vias metabólicas principais, *meta* ou *orto* (SMITH, 1994).

Figura 2.16 - Biodegradação de catecol e dos ácidos protocatecólico e gentístico até a formação de intermediários do ciclo de Krebs. (Modificado de SMITH, 1994).

Na via *meta* a quebra do anel aromático ocorre entre o átomo do carbono adjacente ao grupo hidroxilado do catecol ou do ácido protocatecólico, formando o 2-hidroxi-muconato semialdeído e o 2-hidroxi-4-carboxil-muconato semialdeído, respectivamente, como intermediários da via metabólica e, posteriormente, acetaldeído, oxalacetato ou piruvato dependendo do intermediário formado (DAGLEY, 1975). Na via *orto*, também

conhecida como via β -cetoadipato, a quebra da ligação ocorre entre os átomos de carbono ligados aos dois grupos hidroxilas dos compostos intermediários (catecol e ácido protocatecóico) formando o ácido cis-cis mucônico (muconato) ou carboximuconato e, em seguida, succinato e acetil-coenzima A (SMITH, 1994).

A literatura descreve também um terceiro tipo de via metabólica, denominada via *orto*-modificada ou via do gentisato, conforme apresentado na Figura 2.16. Nesta via, a quebra da ligação entre os dois átomos de carbono resulta na produção do gentisato e, posteriormente, no maleil-piruvato, fumarato e piruvato, podendo em alguns casos formar o metil-acetoacético. Devido à baixa especificidade da indução e função das enzimas da via *orto*, as vias *meta* e a do gentisato são mais comumente utilizadas no catabolismo de um maior número de compostos aromáticos (DAGLEY, 1975).

Em relação aos furanos, a primeira via bioquímica para a degradação aeróbia do furfural foi elucidada por Trudgill (1969) para a bactéria *Pseudomonas putida* F2. Nesta via, o furfural é primeiramente oxidado para ácido 2-furóico por uma enzima aldeído-desidrogenase, sendo este ácido posteriormente ligado a coenzima-A por uma furoil-CoA sintetase. Em seguida, o composto furoil-CoA é hidroxilado na posição C₅ por uma furoil-CoA-desidrogenase e o produto desta reação tautomerizado à sua forma ceto, a qual apresenta a estrutura de anel de uma lactona. O anel desta lactona se abre, catalisada ou espontaneamente, através de reação de hidrólise e em seguida sofre outra reação de tautomerização ceto-enol, formando o composto 2-oxoglutaroil-CoA. Através de hidrólise do tioéster-CoA, o composto 2-oxoglutarato é formado e metabolizado através do ciclo de ácido tricarboxílicos (KOOPMAN et al. 2010; WIERCKX et al., 2011).

Recentemente, Koopman et al. (2010) demonstraram que a bactéria *Cupriavidus Basilensis* HMF14 metaboliza o furfural pela mesma via proposta por Trudgill (1969). Porém, os autores identificaram uma nova enzima essencial para a degradação do ácido 2-furóico - uma tioesterase-CoA. Além disso, foi demonstrado que o 5-HMF segue a mesma via metabólica do furfural, ou seja, o aldeído furânico é primeiramente oxidado ao seu ácido carboxílico correspondente, sendo este ácido também oxidado a ácido 2,5-furano-dicarboxílico (FDCA) por uma enzima HMF-oxirredutase específica. O FDCA é subsequentemente descarboxilado, formando o ácido 2-furóico, seguindo posteriormente a via proposta por Trudgill (1969). Assim, as vias de degradação de ambos os furanos convergem a ácido 2-furóico, conforme elucidado na Figura 2.17.

Figura 2.17 - Representação gráfica da via metabólica do (a) 5-HMF e (b) furfural (B) em *Cupriavidus Basilensis* HMF14. Símbolos coloridos indicam enzimas com as seguintes atividades: furfural/5-HMF oxirredutase (laranja); ácido 2,5-furano-dicarboxílico descarboxilase (vermelho); 2-furoil-CoA sintetase (azul); furoil-CoA desidrogenase (amarelo); 2-oxoglutaroil-CoA hidrolase (roxo). Círculos tracejados indicam aldeído e álcool desidrogenase não específicos. O quadrado preto indica hidrólise da lactona e as reações entre parênteses indicam tautomerização ceto-enólico. ACC indica aceptor oxidado (Ox) ou reduzido (Red). (Modificado de KOOPMAN et al., 2010).

Nichols et al. (2008) empregaram a espécie *Coniochaeta ligniaria* NRRL 30616 para destoxificar o hidrolisado hemicelulósico de palha de milho visando sua posterior utilização para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* LNH-ST. Os autores constataram que o fungo filamentoso foi capaz de consumir completamente 5-HMF (300 mg/L), furfural (160 mg/L), vanilina (12 mg/L), siringaldeído (5 mg/L) e ácido ferúlico (15 mg/L), além de D-glicose, após 24 horas de tratamento. Como resultado, o hidrolisado hemicelulósico de palha de milho destoxificado pelo fungo foi mais eficientemente fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* quando comparado ao hidrolisado não-tratado.

Algumas bactérias como *Ureibacillus thermosphaericus* (OKUDA et al., 2008) e *Enterobacter* sp. (ZHANG et al., 2013) também têm sido empregadas em procedimentos de destoxificação de hidrolisados lignocelulósicos. Por exemplo, Okuda et al. (2008) investigaram a destoxificação biológica de hidrolisado de madeira pela bactéria *Ureibacillus thermosphaericus* NCIMB 13819 (50°C, 2,4 g/L de células por 24 horas). Os autores verificaram que a bactéria foi capaz de reduzir as concentrações de furfural e de 5-HMF em 50 e 20%, os quais estavam presentes no meio em concentrações de 0,25 e 0,18 g/L, respectivamente. Após biotratamento do hidrolisado tratado, foi constatado um aumento de 81% na produtividade volumétrica em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* TJ1, quando comparado com o meio não-tratado.

Empregando a levedura *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 para destoxificar hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, visando uma maior fermentabilidade do meio por *Candida tropicalis* CCTCC M 205067, Hou-Rui et al. (2008) verificaram que a levedura foi capaz de reduzir completamente as concentrações de ácido acético (2 g/L) e furfural (20 mg/L). Os autores constataram um aumento na produtividade volumétrica em xilitol de aproximadamente 2 vezes quando comparado ao hidrolisado não tratado. Fonseca et al. (2011) empregando a mesma espécie, verificaram reduções nas concentrações de siringaldeído (67%), ácido ferúlico (73%), furfural (62%) e 5-HMF (85%) ao destoxificar hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

A obtenção de cepas de micro-organismos resistentes aos compostos tóxicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos constitui um método biológico capaz de melhorar a fermentabilidade destes meios. Estes procedimentos, também conhecido como processos de adaptação, baseiam-se no cultivo sucessivo do micro-organismo em concentrações crescentes do meio contendo compostos tóxicos (CARNEIRO, 2011).

Diferentes estratégias de adaptação de leveduras em hidrolisados lignocelulósicos têm sido reportadas na literatura (NIGAM, 2001; HUANG et al., 2009; OBEROI et al., 2010). Nigam (2001) estudou a adaptação da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de madeira de carvalho contendo 27 g/L de D-xilose e 3,0 g/L de D-glicose a partir de cultivos em meio líquido. A adaptação foi realizada por transferências sucessivas neste meio até que a cultura fosse capaz de tolerar 60% (v/v) do hidrolisado hemicelulósico. Em meio constituído de 50% (v/v) de hidrolisado, a cepa apresentou rendimentos em etanol de 0,31 g/g e produtividade volumétrica em etanol de 0,10 g/L.h, enquanto que a cepa original mostrou valores de 0,22 g/g e 0,034 g/L.h, respectivamente. Os autores relataram ainda que a cepa adaptada se apresentou estável por um período de 3 meses quando testada neste hidrolisado hemicelulósico.

Carneiro (2011) desenvolveu uma cepa adaptada de *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 com o objetivo de aumentar a tolerância aos compostos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Este autor realizou três cultivos sucessivos em meios contendo o hidrolisado nas proporções de 25, 45 e 60% (v/v) e constatou que o emprego de células adaptadas por transferências sucessivas proporcionou ganhos apenas na produtividade volumétrica em etanol (50%), quando fermentado o hidrolisado em biorreator de bancada. No entanto, a fermentação em frascos agitados proporcionou aumentos de 35 e 85% no fator de conversão de substrato em produto e produtividade volumétrica em etanol, respectivamente, com relação à fermentação realizada sem transferência sucessiva.

2.8. *Saccharomyces cerevisiae* como agente de biotransformação de compostos aromáticos

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos modelos de células eucarióticas mais estudados no que se refere aos aspectos fisiológico, genético e bioquímico. Este micro-organismo se destaca como a espécie mais explorada comercialmente entre as leveduras e apresenta grande emprego na indústria, sendo a principal espécie utilizada na produção biotecnológica de etanol. Além disso, é amplamente utilizada em processos fermentativos diversos, como na panificação, bebidas, proteínas recombinantes, fármacos, vacinas entre outros produtos de interesse comercial (LODOLO et al., 2008). É importante ressaltar também, que esta levedura é certificada como organismo GRAS (*General Recognized As Safe*).

De acordo com a literatura, o uso de *Saccharomyces cerevisiae* como mediador em reações orgânicas tem sido amplamente estudado, sendo um dos biocatalisadores mais popularmente empregado na redução/oxidação de compostos carbonílicos, incluindo alguns derivados aromáticos (FABER, 2004; LIU, 2011). Liu (2011) reportou que a levedura é capaz de converter aldeídos aromáticos em seus correspondentes álcoois e/ou ácidos, assim como de promover a descarboxilação de ácidos fenólicos, com formação de compostos menos tóxicos ao metabolismo de diversos micro-organismos fermentativos, conforme ilustrado na Figura 2.18.

Figura 2.18 - Ilustração esquemática demonstrando a conversão de furanos e compostos fenólicos em células de *Saccharomyces cerevisiae* (Modificado de LIU, 2011).

Avaliando o efeito da oxigenação sobre a biotransformação de 5-HMF (4 g/L) por *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066, em meio contendo 50 g/L de D-glicose, Taherzadeh et al. (2000) concluíram que a condição de oxigenação não afetou o fator de conversão deste furano, sendo verificadas quase que exclusivamente a formação do álcool 5-HMF, com uma taxa de conversão de 0,14 g/g.h. Os autores observaram também a presença de um composto com absorvidade máxima em 210 nm (composto não identificado); além de

ácido 5-HMF, em concentrações inferiores a 1%. Após esgotamento total da hexose, verificou-se também que a levedura não foi mais capaz de converter o 5-HMF. No mesmo trabalho, foi avaliada a adição de 5-HMF (2 g/L) concomitantemente com a adição de furfural (2 g/L) sendo observado conversão de furfural em álcool furfuril antes da conversão do 5-HMF. Os fatores de conversão destes furanos em seus correspondentes álcoois e/ou ácidos, quando empregado ambos os furanos, foram menores do que os reportados para os meios contendo individualmente estes compostos, com taxa específica de conversão do furfural e do 5-HMF de 0,24 e 0,03 g/g.h, respectivamente.

Modig et al. (2008) avaliaram o efeito do 5-HMF (1,9 g/L) e do furfural (0,5 g/L) sobre a fermentação de hidrolisado ácido de *spruce* por seis espécies de *Saccharomyces cerevisiae* e constataram que a concentração de furfural foi completamente reduzida do meio ao empregar todas as espécies estudadas, com uma taxa de 0,02 a 0,05 g/g.h. Em contrapartida, a redução na concentração de 5-HMF foi dependente da cepa. Por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* TMB3000 foi capaz de reduzir totalmente o furano em uma taxa de 0,117 g/g.h, enquanto que para a espécie CBS 8066 esse valor foi 93% inferior. Os autores mostraram também que a conversão dos furanos pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 foi inferior em hidrolisados lignocelulósicos, quando comparados com cultivos em meio semissintético contendo D-glicose como fonte de carbono.

Dentre as enzimas presentes em *Saccharomyces cerevisiae* com capacidade de reduzir aldeídos furânicos em seus correspondentes álcoois, destacam-se as álcoois desidrogenases ADH7, ADH6 e ADH1 e a aldeído desidrogenase ALD4, que têm sido reportadas para diversas espécies da levedura (MA; LIU, 2010; LIU; BLASCHEK, 2010; MOON; LIU, 2012). Embora algumas dessas enzimas tenham sido caracterizadas como álcool desidrogenase, o estudo cinético de ADH6 e ADH7, por exemplo, conduzidos por Larroy et al. (2002), mostrou que suas reações redutoras foram de 50 e 100 vezes mais eficientes do que as oxidações correspondentes, ou seja, é possível dizer que estas enzimas atuam mais como uma aldeído redutase do que com uma álcool desidrogenase.

A Figura 2.19 apresenta as etapas de conversão do furfural e 5-HMF por *Saccharomyces cerevisiae*, e as possíveis vias de degradação de D-glicose quando estes furanos estão presentes no meio fermentativo. De acordo com Liu (2011), os furanos são convertidos em seus correspondentes álcoois, catalisadas por diversas aldeído-redutases, juntamente com os cofatores NADH e NADPH.

Figura 2.19 - Ilustração esquemática das vias metabólicas da D-glicose e conversão de furfural e 5-HMF por *Saccharomyces cerevisiae*. Níveis normais das reações, expressões ou percursos (setas pretas); níveis reforçados (setas verdes) e expressões, reações ou caminhos reprimidos (setas vermelhas). As etapas-chave da regeneração de NADPH estão representadas por círculos azuis e as reduções dos aldeídos em círculo laranja. As linhas pontilhadas representam as interações de regeneração dos cofatores. FM (álcool furfuril) e FDM (álcool-HMF). (Modificado de LIU, 2011).

As presenças de furfural e 5-HMF no meio fermentativo podem causar um desequilíbrio redox, interferindo negativamente na via glicolítica, crescimento celular e biossíntese, uma vez que o cofator NADH é necessário tanto na via oxidativa quanto na via fermentativa para a conversão de acetaldeído em etanol e o NADPH é fundamental para a síntese de aminoácidos e nucleotídeos, sendo produzido através da fase oxidativa das pentoses fosfato. Na presença destes inibidores, o nível de ATP também é reduzido, assim como a D-glicose é pobremente consumida até que os níveis adequados de redução na concentração de furfural e/ou 5-HMF sejam atingidos (LIU, 2011).

Assim como relatado para os furanos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* também apresenta a capacidade de converter aldeídos e ácidos fenólicos a seus correspondentes álcoois. Dentre estes fenólicos, presentes em hidrolisados lignocelulósicos, a vanilina e o ácido ferúlico são os compostos mais estudados em reações de biotransformação por esta levedura (FITZGERALD; STRATFORD; NARBAD, 2003; COGHE et al., 2004; HANSEN et al., 2009; MUKAI et al., 2010; DING et al., 2011; MADEIRA JUNIOR; TEIXEIRA; MACEDO, 2013).

A biotransformação de alguns dos aldeídos aromáticos presentes em hidrolisados lignocelulósicos foi avaliada por Larsson et al. (2000) em cultura de *Saccharomyces cerevisiae* de panificação cultivada em meio contendo D-glicose como fonte de carbono. Os compostos fenólicos do grupo hidróxi-metóxi-benzaldeídos avaliados (vanilina, *o*-vanilina e isovanilina) foram convertidos a seus correspondentes álcoois quando adicionados em concentrações de 200 mg/L. Entretanto, a velocidade de biotransformação destes compostos foi dependente da posição dos grupos hidroxilas e metoxilas presentes no anel benzênico. Verificou-se, após 12 horas de ensaio, redução de aproximadamente 10, 60 e 90% nas concentrações de *o*-vanilina, vanilina e isovanilina, respectivamente. Neste mesmo estudo, os autores avaliaram também os produtos de conversão do aldeído coniferil, sendo verificada a formação de álcool coniferil e álcool dihidroconiferil. Ao empregarem 180 mg/L do aldeído, observaram após 12 horas, conversão de aproximadamente 88% do composto, com formação de 80 e 40 mg/L de álcool dihidroconiferil e álcool coniferil, respectivamente.

A conversão de vanilina em meio YPD (pH 4,0) por *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 956 foi estudada por Fitzgerald, Stratford e Narbad (2003). A taxa de conversão da vanilina em álcool vanilil de 1:1 foi observada apenas quando a levedura foi cultivada em presença de 150 mg/L do aldeído. Contudo, com o aumento da concentração de vanilina (1,0 g/L) esta taxa diminuiu e teores inferiores de álcool foram medidos e, ainda que em

baixos níveis, a presença de ácido vanílico foi constatada, não sendo verificado produto de bioconversão quando empregadas concentrações superiores a 2 g/L do aldeído. Os autores sugerem que nesta concentração elevada de vanilina os processos metabólicos essenciais poderiam ser afetados negativamente, seja por inibição direta das enzimas oxirredutases, como a álcool desidrogenase, ou pela redução de cofatores essenciais nesta bioconversão.

Wulf et al. (1986) avaliaram a influência do pH e da temperatura sobre a conversão de vanilina (500 mg/L) por *Saccharomyces cerevisiae* 1278b em meio contendo D-glicose. Quando os ensaios foram realizados em pH 5,0, variando a temperatura de 30 a 55°C, os autores observaram que a maior produção de álcool vanilil ocorreu na menor temperatura empregada (30°C) e ao elevar a temperatura para 55°C não foi verificada a presença do álcool. No mesmo estudo foi verificado também a influência do pH sobre a produção de álcool vanilil pela levedura, ao variar o parâmetro de 2,0 a 5,0. Os autores observaram a maior concentração de álcool vanilil (170 mg/L) quando cultivada a levedura em pH 3,0 e temperatura de 30°C, o que representou um aumento de 88 e 79% quando comparado com os cultivos realizados em pH 2,0 e 5,0, respectivamente.

De acordo com Liu (2011), algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* também apresentam capacidade natural de reduzir ácidos fenólicos. Este fato pode estar associado à presença da enzima ácido fenilacético descarboxilase (PAD), que atua nos ácidos *p*-cumárico, cinâmico e ferúlico. Esta enzima age diretamente na clivagem do C₁ da cadeia lateral dos ácidos fenólicos, resultando na formação de 4-vinil-guaiacol, entre outros produtos.

Huang, Dostal e Rosazza (1993) ao cultivarem *Saccharomyces cerevisiae* de panificação em condições de aerobiose em meio sintético contendo ácido ferúlico (1,0 g/L), observaram a formação de 4-vinil-guaiacol como produto de conversão. Foi observado um pico máximo na concentração do produto após 2 horas, atingindo valores próximos a 800 mg/L. Após esse período, a concentração do álcool diminuiu, sendo completamente esgotada do meio após 6 horas.

O 4-vinil-guaiacol, assim como as formas reduzidas e oxidadas da vanilina, foram encontradas como produtos de degradação do ácido ferúlico em diversas culturas, como em *Debaryomyces hansenii* (MATHEW; ABRAHAM; SUDHEESH, 2007), *Candida lambica* (DONAGHY; KELLY; McKAY, 1999) e *Schizophyllum commune* (TSUJIYAMA; UENO, 2008). Alguns autores sugerem esta mesma via de degradação

do ácido ferúlico em *Saccharomyces cerevisiae*, conforme ilustra a Figura 2.20. Mukai et al (2010) avaliaram a atividade de descarboxilação do ácido ferúlico quando cultivada diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo D-glicose (20 g/L). Os autores concluíram que a reação é dependente de duas enzimas principais, denominadas PAD1 e FDC1. Nos ensaios em que apenas uma dessas enzimas foi expressa, não verificou a formação do 4-vinil-guaiacol.

Figura 2.20 - Via proposta para o catabolismo de ácido ferúlico em *Saccharomyces cerevisiae*, conforme verificado para outros micro-organismos, como por exemplo, em *Debaryomyces hansenii*. (Modificado de MATHEW; ABRAHAM; SUDHEESH, 2007).

Diante do exposto, o presente estudo propõe o uso de *Saccharomyces cerevisiae* de panificação como agente biológico de tratamento de hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e poda de oliveira, uma vez que esta levedura é capaz de converter aldeídos e ácidos aromáticos (furanos e compostos fenólicos) em seus correspondentes álcoois e/ou ácidos, os quais são considerados menos tóxicos para diversos micro-organismos fermentativos, incluindo *Pichia stipitis*. Além disso, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não consome D-xilose, o principal açúcar presente em diversos hidrolisados hemicelulósicos, o que torna o processo vantajoso.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar a capacidade de *Saccharomyces cerevisiae* em metabolizar os compostos tóxicos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e poda de oliveira, visando melhorar a fermentabilidade destes hidrolisados por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar quimicamente os hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e poda de oliveira;
- ✓ Determinar a concentração dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de poda de oliveira na qual o bioprocesso de produção de etanol por *Pichia stipitis* sofra inibição;
- ✓ Avaliar o tempo de tratamento biológico por *Saccharomyces cerevisiae* em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de poda de oliveira, assim como em meio sintético mimetizando a concentração dos principais componentes em açúcares e compostos tóxicos presentes no hidrolisado de palha de arroz;
- ✓ Avaliar a fermentabilidade dos meios biotratados (sob condições previamente estabelecidas) empregando a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124;
- ✓ Avaliar o efeito da concentração celular, pH e agitação sobre o tratamento do hidrolisado de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae* através da metodologia do planejamento experimental, visando máximos valores de fator de conversão de substrato em produto e produtividade volumétrica em etanol de *Pichia stipitis*;
- ✓ Avaliar o perfil cinético da fermentação de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz biotratado nas condições previamente selecionadas, empregando fermentador de bancada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentação I do Departamento de Biotecnologia Industrial da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo e nos Laboratórios do Departamento de Engenharia Química, Meio Ambiente e de Materiais do Grupo de Bioprocessos da Universidade de Jaén.

4.1. Obtenção e concentração dos hidrolisados hemicelulósicos

4.1.1. Matéria-prima

A palha de arroz, fornecida por produtores de arroz da região de Lorena/SP, foi exposta ao sol para secagem e moída a 2,0 x 0,5 cm em moinho de martelo (BEMEDETTI – dupla 270). O resíduo de poda de oliveira foi obtido de produtores da região de Jaén/Espanha, sendo constituído de folhas e madeiras em uma proporção de 1:2 (m/m). O material foi secado ao sol, moído (30-40 mm) e tamisado para separar a fração de granulometria 0,425-0,600 mm. Ambos os materiais foram pesados, ensacados, caracterizados e armazenados até a realização do processo de hidrólise empregando ácido diluído.

4.1.2. Hidrólise ácida e concentração dos hidrolisados hemicelulósicos

O hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foi obtido por catálise ácida em reator de aço inox (AISI 316) com capacidade nominal de 350 litros, aquecido indiretamente por resistência elétrica por meio de uma camisa de óleo. Foram empregados 17,3 Kg de matéria-prima seca (20 Kg de palha com $13,40 \pm 0,42\%$ de umidade) e a reação foi realizada com ácido sulfúrico (98% p/p), na concentração de 100 mg $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{g}$ de matéria seca, a 126°C por 30 minutos e relação sólido:líquido de 1:10, de acordo com o procedimento descrito por Roberto, Mussatto e Rodrigues (2003). Após reação de hidrólise foi realizada a filtração do material para separação da fração líquida (hemicelulose) dos resíduos sólidos (celulignina). O hidrolisado hemicelulósico obtido foi concentrado oito vezes por processo de evaporação a vácuo $70^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ visando aumentar o teor de D-xilose. Este processo foi realizado em concentrador (*Precision Scientific* – U.S.A) com 5 litros de capacidade nominal, operado de forma descontínua.

O hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira foi obtido por catálise ácida em autoclave, realizada em frascos Erlenmeyer com capacidade de 2000 mL e um volume útil

de 1000 mL. Para a obtenção do hidrolisado foram empregados 100 g de resíduo seco de poda (105,4 g de matéria-prima com $5,4 \pm 0,1$ % de umidade) e um volume total da solução ácida de 1000 mL. A reação foi realizada com ácido sulfúrico (2%) em uma proporção de ácido concentrado (98% p/p) de 100 mg/g de matéria seca e uma relação de matéria seca solúvel/solução ácida de 1:10, a 121°C durante 90 minutos, sem agitação e pressão manométrica de 180 Kpa, conforme descrito por Mateo et al. (2013). Após processo de hidrólise, o hidrolisado de poda de oliveira foi filtrado para se separar os resíduos sólidos constituídos de celulignina da fração líquida e conservado a 4°C . Com o objetivo de aumentar o teor dos açúcares fermentescíveis em cinco vezes, o hidrolisado foi concentrado em rota-vapor, a uma temperatura de aproximadamente $70 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

4.2. Biotransformação de compostos tóxicos por *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.1. Micro-organismo

Para a realização do presente trabalho utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial liofilizada com 2,5% de umidade (Dr. Oetker® - Lotes: ABR 2014 3 105, MAI 2012 2 136). A massa desejada da levedura foi reidratada em água destilada estéril, em uma relação de massa seca/água destilada de 1:10, por período de 10 minutos à temperatura ambiente (Thomaz, 2008), imediatamente antes do uso. Nessas condições verificou-se viabilidade celular igual ou superior a 85%.

Figura 4.1 - *Saccharomyces cerevisiae* comercial liofilizada Dr. Oetker®.

4.2.2. Ensaio de biotransformação em meio sintético

Nos ensaios de biotransformação por *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético foi utilizado uma solução de açúcares (15 g/L de D-glicose, 80 g/L de D-xilose e 15 g/L de L-arabinose), adicionados de ácido acético, furanos e compostos fenólicos, os quais foram avaliados individualmente e em combinação conforme apresentado na Tabela 4.1. Estas concentrações foram baseadas nos teores de açúcares e compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregado no presente estudo.

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de biotransformação. O pH inicial foi ajustado para 5,5 com solução estéril de NaOH (0,5%). Os frascos foram inoculados com 10 g/L de células reidratadas de *Saccharomyces cerevisiae* e posteriormente incubados em agitador rotatório a 200 rpm e 30°C por 10 horas. A massa desejada de todos os compostos fenólicos e 5-HMF foram adicionadas diretamente na solução de açúcares previamente autoclavada a 112°C por 15 minutos, imediatamente antes da inoculação. Para o ácido acético e furfural, foi adicionado o volume necessário de forma a obter a concentração desejada.

Tabela 4.1 – Componentes tóxicos adicionados a meios sintéticos visando estudar a biotransformação destes compostos por *Saccharomyces cerevisiae*

Meios de Biotransformação	Composição (g/L)					
	Ácido Acético	5-HMF	Furfural	Vanilina	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido Ferúlico
A	2,00	-	-	-	-	-
B	-	0,40	-	-	-	-
C	-	-	0,12	-	-	-
D	-	-	-	0,05	-	-
E	-	-	-	-	0,12	-
F	-	-	-	-	-	0,30
G	2,00	0,40	0,12	0,05	0,12	0,30

4.3. Ensaio de biotransformação em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e poda de oliveira

Primeiramente, foi avaliado o tempo de tratamento dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e poda de oliveira por *Saccharomyces cerevisiae*. Os

valores de pH dos hidrolisados foram ajustados para 5,5 com pastilhas de NaOH e, em seguida, foram centrifugados por 15 minutos a 1000xg para a remoção de precipitados. Os ensaios de biotransformação foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de hidrolisado sob agitação de 200 rpm, 30°C e uma massa seca de levedura de 0,5 g (~ 10 g/L), reidratada conforme descrito no item 4.2.1.

Para o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, uma segunda etapa foi realizada com o objetivo de avaliar o efeito das variáveis: concentração de *Saccharomyces cerevisiae*, pH e fator de aeração, no tratamento do hidrolisado sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis*. Para isto, foi empregado um planejamento experimental fatorial composto 2^3 com face centrada e quadruplicata no ponto central, conforme apresentado na Tabela 4.2. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, sob agitação de 200 rpm, 30°C, por um período de 6 horas, porém, o volume de hidrolisado hemicelulósico empregado variou de acordo com os diferentes níveis de aeração desejados. A massa de *Saccharomyces cerevisiae* necessária para cada ensaio do planejamento foi reidratada conforme descrito no item 4.2.1.

Tabela 4.2 - Níveis e valores dos fatores estudados no planejamento experimental fatorial composto 2^3 com face centrada e quadruplicata no ponto central

Variáveis	Níveis				
	$-a$	Inferior (-1)	Médio (0)	Superior (+1)	$+a$
X₁ = Biomassa (g/L)	5,0	5,0	10,0	15,0	15,0
X₂ = pH	3,0	3,0	5,5	8,0	8,0
X₃ = Aeração*	3,5	3,5	5,0	6,5	6,5

* Os níveis de aeração foram determinados relacionando o volume útil dos frascos Erlenmeyer com o volume do hidrolisado empregado.

As análises dos dados foram efetuadas pelo programa *Design-expert*, considerando os níveis de significância de 90% de confiança. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativas de efeitos, erro-padrão, teste t de *Student*, assim como tabelas de análises de variância com colunas de causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e nível de significância (*p*).

Como respostas deste tratamento foram avaliadas o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e a produtividade volumétrica em etanol (Q_P), obtidos durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Pichia stipitis*.

4.4. Processo fermentativo

4.4.1. Micro-organismo, preparo do inóculo e condições de cultivo

Na etapa fermentativa do presente trabalho, foi utilizada a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, fornecida pela *United States Department of Agriculture* - USDA de Peoria, Illinois, EUA. 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 Ágar YMDP (extrato de malte 3,0 g/L, extrato de levedura 3,0 g/L, peptona 5 g/L, D-glicose 10 g/L, ágar-ágar 20 g/L), transferidas periódicas e conservada em geladeira a 4°C.

O inóculo utilizado para as fermentações em meio semissintético e em hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira foi cultivado em (g/L): D-xilose (30,0), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,1), $(NH_4)_2HPO_4$ (3,0), KH_2PO_4 (18,8) e extrato de levedura (3,0). Foram utilizadas soluções concentradas de cada componente, as quais foram preparadas separadamente e esterilizadas a 121°C por 20 minutos, exceto a solução de D-xilose, que foi autoclavada a 112°C por 15 minutos. As soluções foram então misturadas assepticamente de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente no meio de crescimento.

Para as fermentações em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, o inóculo foi cultivado no próprio hidrolisado (não-tratado) com as concentrações de açúcares ajustadas por meio de diluição para (g/L): D-xilose (30,0), D-glicose (3,6), L-arabinose (3,6), acrescidas de 3,0 g/L de extrato de levedura.

Os inóculos foram preparados transferindo-se uma alçada de células proveniente do repique em meio de manutenção para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio (semissintético ou hidrolisado hemicelulósico não-tratado). Os frascos inoculados foram incubados em agitador rotatório a 30°C, sob agitação de 200 rpm, por 24 horas. Após o cultivo do inóculo, as células foram separadas por centrifugação a 1100xg por 20 minutos e ressuspensas em água destilada de forma a se obter uma suspensão celular

densa. A partir desta suspensão foi calculado o volume necessário para inocular o meio de fermentação com uma concentração celular inicial de 1,0 g/L de *Pichia stipitis*.

4.4.2. Fermentação em frascos agitados

Antes dos ensaios fermentativos, os meios avaliados (semissintético e hidrolisados hemicelulósicos) tiveram os seus pH ajustados com pastilhas de NaOH ou H₂SO₄ 10 M, conforme necessário. Após cada alteração de pH, os hidrolisados foram centrifugados por 15 minutos a 1000xg para a remoção de precipitados.

4.4.2.1. Fermentação em meio semissintético

O meio semissintético a ser estudado foi composto pelos açúcares e principais compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz previamente tratado por *Sacharomyces cerevisiae*, conforme apresentado na Tabela 4.1 (ensaio G). O meio foi suplementado com (g/L): MgSO₄.7H₂O (1,1), (NH₄)₂HPO₄ (3,0), KH₂PO₄ (18,8) e extrato de levedura (3,0). As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio previamente tratado com *Saccharomyces cerevisiae* (item 4.2.2). Os frascos foram então incubados em agitador de movimento rotatório a 200 rpm, 30°C por 72 horas, e inoculados com uma concentração celular inicial de *Pichia stipitis* de 1,0 g/L. Durante as fermentações foram retiradas amostras em intervalos periódicos para o acompanhamento do pH, consumo de açúcares, produção de etanol, crescimento celular, concentração dos compostos tóxicos e varredura espectral na região do ultravioleta.

4.4.2.2. Fermentação em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e poda de oliveira

As fermentações em hidrolisados hemicelulósicos foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio previamente tratado com células de *Saccharomyces cerevisiae* e incubados em agitador rotatório a 30°C, 200 rpm, por 96 horas. O hidrolisado de palha de arroz foi suplementado com 3,0 g/L de extrato de levedura (SILVA, 2007), enquanto que para o hidrolisado de poda de oliveira foram

adicionados $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L), KH_2PO_4 (2 g/L), peptona (3,6 g/L) e extrato de levedura (4,0 g/L).

Para o acompanhamento do consumo de açúcares e ácido acético, produção de etanol, crescimento celular, variação de pH e consumo dos compostos fenólicos e furânicos, durante as fermentações foram retiradas amostras em períodos regulares de 24 horas.

4.5. Cinética do processo fermentativo em biorreator de bancada

O perfil fermentativo de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não-tratado e tratado com *Saccharomyces cerevisiae* foi estudado em biorreator de bancada. Nesta etapa, foi utilizado um biorreator tipo tanque agitado modelo BIOSTAT B (*B. Braun Biotech International* – Alemanha) equipado com uma cuba de vidro com 2 litros de capacidade total e controle de temperatura, agitação, aeração e pH, munido de duas turbinas de 6 pás planas. O volume de meio fermentativo foi de 1,2 litros e a condição de transferência de oxigênio utilizada foi de K_{La} próximo a 14 h^{-1} . O hidrolisado foi inoculado com 1 g/L de células e a temperatura foi mantida a 30°C no decorrer da fermentação, sendo retiradas amostras periodicamente para o acompanhamento das concentrações de células, açúcares e etanol.

4.6. Métodos analíticos

4.6.1. Caracterização das matérias-primas

4.6.1.1. Determinação do teor de umidade

Para as amostras de palha de arroz, aproximadamente 2,0 g do material foram colocados em uma balança de secagem por radiação infravermelha (IV 2000 Gehaka). A secagem foi realizada a uma temperatura de 105°C até massa constante (variação de massa menor que 0,0005 g/min).

Para o resíduo da poda de oliveira, a umidade foi determinada segundo a norma TAPPI 11 m-59, a partir da perda de peso de uma amostra de aproximadamente 1,0 g quando submetida a uma temperatura constante de $105 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o período suficiente para alcançar peso constante. A porcentagem da umidade neste material foi determinada mediante a equação 4.1.

$$U(\%) = \frac{M_U - M_s}{M_s} \times 100 \quad (4.1)$$

Sendo:

M_U = Massa da amostra úmida (g)

M_s = Massa da amostra seca (g).

4.6.1.2. Determinação de extratos aquosos e alcoólicos

4.6.1.2.1. Determinação de extratos aquosos

Para a determinação dos extratos aquosos em palha de arroz e poda de oliveira foram pesados aproximadamente 10 g de material seco, embalado em papel de filtro devidamente tarado e adicionados 350 mL de água ultrapura, submetendo-se posteriormente a mistura à ebulição em *soxlet* de 250 mL sobre uma placa calefatora de 2000 W de potência durante 24 horas. Em seguida, a amostra foi secada em estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 24 horas. Depois o material foi retirado do papel de filtro e secado até alcançar peso constante. O conteúdo em extrato aquoso (%) foi calculado mediante a equação 4.2.

$$\text{ExtAq}(\%) = \frac{M_{Si} - M_{SEaq}}{M_{Si}} \times 100 \quad (4.2)$$

Sendo:

M_{Si} = Massa seca inicial (g)

M_{SEaq} = Massa seca do extrato aquoso (g).

4.6.1.2.2. Determinação de extratos alcoólicos

A massa seca de palha de arroz e de poda de oliveira proveniente da extração aquosa foi empregada para determinação dos extratos alcoólicos. O material foi embalado em papel de filtro devidamente tarado e adicionados 350 mL de etanol, submetendo-se a mistura posteriormente à ebulição em *soxlet* de 250 mL sobre uma placa calefatora de 2000 W de potência durante 24 horas. Em seguida, a amostra foi secada

em estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas até obter peso constante. Para determinar o conteúdo em extrato alcoólico (%) foi empregada a equação 4.3.

$$\text{ExtAlc}(\%) = \frac{M_{\text{Si}} - M_{\text{SEAIC}}}{M_{\text{Si}}} \times 100 \quad (4.3)$$

Sendo:

M_{Si} = Massa seca inicial (g)

M_{SEAIC} = Massa seca do extrato alcoólico (g).

4.6.1.3. Determinação de celulose, hemicelulose, lignina insolúvel (Klason), lignina solúvel, grupo acetil e cinzas

A palha de arroz e a poda de oliveira foram caracterizadas quanto ao teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, baseando-se na metodologia descrita por Browning (1967). Aproximadamente 2,0 g de matéria-prima seca *in natura* (MP) foram transferidos para um béquer de 50 mL contendo 10 mL de ácido sulfúrico (72% p/p). A mistura foi mantida em banho termostatzado a 60°C por 7 minutos, sob agitação constante com bastão de vidro. Após esse período, foram utilizados 275 mL de água destilada de forma a transferir quantitativamente todo o conteúdo do béquer para um Erlenmeyer de 500 mL de volume útil, provocando a interrupção da reação. Em seguida o frasco foi fechado com papel alumínio e levado a autoclave a 1 atm, 121°C por 45 minutos, para completa hidrólise dos oligômeros restantes.

Após a reação de hidrólise o frasco foi resfriado à temperatura ambiente e o material sólido restante foi separado da fração líquida por filtração em papel de filtro quantitativo previamente tarado. O hidrolisado foi recolhido em um balão volumétrico de 500 mL e o sólido contido no papel de filtro foi lavado com água destilada de forma a fazer com que esta água fosse totalmente recolhida no mesmo balão.

A fração líquida obtida foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e as concentrações de D-glicose, D-xilose, L-arabinose e ácido acético foram utilizados para determinar as porcentagens de celulose, hemicelulose e grupo acetil existentes nos materiais empregados no presente estudo. O teor da celulose foi calculado através da equação 4.4, levando em consideração a massa de D-glicose presente na fração líquida. Os teores de hemicelulose (equação 4.5) e grupo acetil (equação 4.6) foram

calculados sobre as massas dos açúcares presentes na hemicelulose e do ácido acético, respectivamente.

$$\% \text{ Celulose} = \frac{M_G}{M_{MP}} \times F_C \times F_{ph} \times 100 \quad (4.4)$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \frac{(M_X + M_A)}{M_{MP}} \times F_C \times F_{ph} \times 100 \quad (4.5)$$

$$\% \text{ Grupo Acetil} = \frac{M_{HAc}}{M_{MP}} \times F_C \times 100 \quad (4.6)$$

Onde:

M_G = Concentração de D-glicose (g/L) x 0,5 L

M_{MP} = Massa seca das matérias-primas *in natura*

M_X = Concentração de D-xilose (g/L) x 0,5 L

M_A = Concentração de L-arabinose (g/L) x 0,5 L

M_{HAc} = Concentração de ácido acético (g/L) x 0,5 L

F_{ph} = Fator de perda de hidrólise: celulose (1,055) e hemicelulose (1,155)

F_C = Fator de conversão: celulose (0,90) e hemicelulose (0,88) e grupo acetil (0,72)

O resíduo sólido (RS) retido no papel de filtro (lignina insolúvel) foi lavado novamente (1,5 L de água destilada) e secado em estufa a 105°C até atingir peso constante. Em seguida, para determinar o teor de cinzas, o RS foi submetido a um tratamento térmico em mufla, a 800°C, por 2 horas, até obtenção de peso constante. As porcentagens de lignina insolúvel e de cinzas presentes na palha de arroz foram calculadas de acordo com as equações 4.7 e 4.8, respectivamente.

$$\% \text{ Lignina insolúvel} = \frac{M_{RS}}{M_{MP}} \times 100 \quad (4.7)$$

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{M_{cinzas}}{M_{MP}} \times 100 \quad (4.8)$$

Onde:

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

M_{MP} = Massa seca das matérias-primas *in natura*

M_{Cinzas} = Massa de cinzas após calcinação

Para determinação da lignina solúvel em meio ácido foi utilizada a metodologia descrita por Rocha, 2000. Uma alíquota de 5 mL do hidrolisado foi alcalinizada até pH 12 pela adição de NaOH (6 M) e diluída em 100 mL de água destilada. A absorbância desta solução foi determinada com uso de espectrofotômetro (Hitachi High Technologies Corporation, Tokyo, Japan), em comprimento de onda a 280 nm e utilizando-se água destilada como referência (A_{Lig280}). A concentração de lignina solúvel (LS) foi calculada de acordo com as Equações 4.9 e 4.10, 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 obtida conforme demonstrado na equação 4.11.

$$A_{PD280} = (C_F \times \varepsilon_F + C_{HMF} \times \varepsilon_{HMF}) \quad (4.9)$$

$$C_{LS} = [4,187 \times 10^{-2} (A_{Lig280} - A_{PD280}) - 3,279 \times 10^{-4}] \quad (4.10)$$

$$\%Lignina \text{ solúvel} = \frac{C_{LS} \times 0,5 \times 100}{M_{MP}} \quad (4.11)$$

Onde:

C_F = Concentração de furfural (g/L)

ε_F = Coeficiente de extinção do furfural (146,85 L/g.cm)

C_{HMF} = Concentração de 5-hidroximetilfurfural (g/L)

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

C_{LS} = Concentração de lignina solúvel em meio básico (g/L)

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

M_{MP} = Massa seca das matérias-primas *in natura*

4.6.2. Determinação do pH

Os valores de pH das amostras de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e dos meios semissintéticos foram determinadas por potenciometria em um aparelho HANNA HI221. Para o hidrolisado de poda de oliveira foi utilizado um aparelho Basic 20 – Crison.

4.6.3. Espectro de varredura na região do ultravioleta

O espectro de varredura na região do ultravioleta dos ensaios em hidrolisado de palha de arroz e meio definido foi realizado em espectrofotômetro Hitachi U-1800. Por outro lado, para os ensaios em hidrolisado de poda de oliveira empregou-se um aparelho Unicam ATI – UV/VIS Spectrometer UV2. Estas análises foram realizadas na faixa do ultravioleta de 200 a 500 nm, com passo de 5 nm, utilizando-se cubeta de quartzo. A determinação do espectro de varredura foi realizada com os hidrolisados e meios sintéticos diluídos 1000 e 100 vezes, respectivamente. O pH destes meios foi ajustado para aproximadamente 12, tendo uma solução alcalina com pH 12 como branco.

4.6.4. Determinação da concentração celular

O crescimento celular das leveduras empregadas no presente estudo foi acompanhado em espectrofotômetro, por medida das absorbâncias a 600 nm utilizando água destilada como branco. A massa celular proveniente de amostras de volume conhecido foi lavada com água destilada e devidamente diluída para uma faixa de leitura entre 0,1 e 0,5 unidade de densidade óptica (DO). A concentração celular foi determinada utilizando-se a equação obtida por regressão linear dos dados de uma curva de calibração entre peso seco e absorbância.

4.6.5. Determinação dos teores de açúcares, ácido acético, glicerol, xilitol e etanol

Os teores de D-glicose, D-xilose, L-arabinose, glicerol, xilitol, ácido acético e etanol foram determinados por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para os ensaios em meio sintético e semissintético, bem como em hidrolisado de palha de arroz, as análises foram realizadas em um aparelho Agilent Technologies 1260 Infinity com detector de índice de refração. Por outro lado, para as análises em hidrolisado de poda de oliveira foi empregado um aparelho Shimadzu Prominence LC-20. Para ambas as determinações foram utilizadas colunas BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm) (Hercules, CA, USA), nas seguintes condições: temperatura de 45°C; eluente: ácido sulfúrico 0,01 N; fluxo do eluente 0,6 mL/min; volume de amostra de 20 µL. Para as análises, as amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em Sep-Pack Cartidge C₁₈ (Waters

Associate – MILLIPORE). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

4.6.6. Determinação dos teores de furfural, 5-hidroximetilfurfural e compostos fenólicos de baixa massa molar

Os monômeros fenólicos e furânicos foram quantificados apenas nos ensaios em meio sintético e em hidrolisado de palha de arroz. Suas concentrações foram determinadas por CLAE, em equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity utilizando a coluna Waters Spherisorb C18 5µm ODS2 4,6 x 100 mm, sob as seguintes condições: temperatura ambiente; eluente: acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético); fluxo 0,8 mL/min; volume de amostra: 20 µL e detector UV a 276 nm. As amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em membranas do tipo HSWP com poros de 0,45 µm (Waters Associate – MILLIPORE). As concentrações destes compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

4.6.7. Determinação dos furanos totais

A concentração de furanos totais foi determinada baseada no método sugerido por Martinez et al. (2000). As amostras dos hidrolisados hemicelulósicos foram diluídas 1000 vezes e filtradas em membranas de tipo HSWP com poros de 0,45 µm (Waters Associate – MILLIPORE). Em seguida, um espectro na região do ultravioleta foi realizado para medida das absorvâncias nas regiões de 285 e 320 nm utilizando-se água destilada como branco.

4.6.8. Determinação dos teores dos produtos derivados da lignina (PDL)

A concentração de compostos fenólicos totais foi quantificada colorimetricamente pelo método modificado de Folin-Ciocalteu (Modificado de SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Para os ensaios em hidrolisado de palha de arroz foi usado ácido gálico como padrão de calibração, enquanto que para o hidrolisado de poda de oliveira usou-se ácido caféico. Inicialmente, as amostras foram centrifugadas a 1300xg por 20 min para a remoção de sólidos. O sobrenadante foi então filtrado em membrana de 0,45 µm e devidamente diluído com água deionizada. Em tubo de ensaio foram adicionados 3,0 mL da amostra e 0,2 mL de reagente de Folin. Após agitação em vórtice, a mistura foi

mantida em repouso por um período de 5 minutos e, em seguida, adicionado 0,8 mL de solução de $(\text{Na})_2\text{CO}_3$ na concentração de 150 g/L. A reação foi mantida em repouso à temperatura ambiente, na ausência de luz por 30 minutos. Depois deste período foi feita a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 760 nm. Para composição do branco, água deionizada foi adicionada em substituição à amostra.

4.7. Determinação dos parâmetros fermentativos

Para a análise dos resultados das fermentações foram determinados os seguintes parâmetros: fatores de conversão de substrato em células (Equação 4.12) e em etanol (Equação 4.13), produtividade volumétrica em etanol (Equação 4.14) e eficiência de conversão (Equação 4.15).

(A) Fator de conversão de substrato em células $Y_{X/S}$ (g/g):

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_{1i} - S_{1f}) + (S_{2i} - S_{2f})} \quad (4.12)$$

(B) Fator de conversão de substrato em etanol $Y_{P/S}$ (g/g):

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_{1i} - S_{1f}) + (S_{2i} - S_{2f})} \quad (4.13)$$

(C) Produtividade volumétrica em etanol Q_P (g/L.h):

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{(P_f - P_i)}{(t_f - t_i)} \quad (4.14)$$

(D) Eficiência de conversão η (%):

$$\eta = \frac{Y_{P/S}(\text{calculado})}{Y_{P/S}(\text{teórico})} \times 100 \quad (4.15)$$

Onde:

X_i e X_f – Concentração inicial e final de células (g/L)

S_{1i} e S_{1f} – Concentração inicial e final de D-glicose (g/L)

S_{2i} e S_{2f} – Concentração inicial e final de D-xilose (g/L)

P_i e P_f – Concentração inicial e final de etanol (g/L)

t_i e t_f – Tempo inicial e final da fermentação (h)

4.8. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada pelo programa *Design Expert* e *Statistica 5* considerando os níveis de significância de 90% de confiança. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativas de efeitos, gráficos de curvas no nível, erro-padrão, teste t de *Student*, assim como tabelas de análise de variância com colunas de causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e nível de significância (p).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização química da palha de arroz e da poda de oliveira

Os teores percentuais dos componentes estruturais (celulose, hemicelulose, lignina e grupo acetil) e não-estruturais (extrativos e cinzas) da palha de arroz e da poda de oliveira empregadas no presente trabalho estão apresentadas na Tabela 5.1. Verifica-se que foram quantificados mais de 90% dos constituintes de ambos os materiais e que, dentre os componentes estruturais, a celulose correspondeu a maior parcela destas matérias-primas. Nota-se ainda que as frações celulósica e hemicelulósica presentes na palha de arroz foram de aproximadamente 1,4 e 1,7 vezes maiores aos encontrados para a poda de oliveira, no entanto, o teor de grupo acetil foi 1,3 vezes menor. Estes resultados encontram-se dentro dos valores reportados na literatura, sendo que para a palha de arroz os teores de celulose, hemicelulose, lignina e grupo acetil situam-se na faixa de: 35 a 43%, 23 a 26%, 14 a 25% e 1,2 a 2,0%, respectivamente (ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2003; OBEROI et al., 2010), enquanto que, para o resíduo da poda de oliveira encontram-se na faixa de 25 a 31% para a celulose, de 13 a 23% para a hemicelulose, de 19 a 24% para a lignina e de 1,8 a 2,5% para o grupo acetil (ROMERO et al., 2007; MATEO et al., 2013).

Com relação aos componentes não-estruturais, nota-se que a poda de oliveira apresentou um elevado teor de extrativos totais (27,1%), sendo o maior componente presente neste material, e este valor correspondeu cerca de duas vezes superior ao observado para a palha de arroz. Tais valores também estão de acordo com a literatura, que apresenta teores de extrativos totais para a poda de oliveira entre de 18 a 32% (CARA et al., 2007; ROMERO et al., 2007) e para a palha de arroz variando de 9 a 15% (SUN et al., 2002; CHEN et al., 2011).

Observa-se ainda na Tabela 5.1 que o teor de cinzas presente na palha de arroz foi cerca de três vezes superior ao da poda de oliveira e que ambos os teores encontraram-se de acordo com a literatura (ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2003; MATEO et al., 2013). De fato, a palha de arroz, quando comparada a outras matérias-primas lignocelulósicas, apresenta maiores valores deste componente, o qual pode variar de 12 a 20% da massa seca total do material, dependendo do estado de conservação da matéria-prima após a colheita.

Tabela 5.1 – Componentes estruturais e não-estruturais da palha de arroz e da poda de oliveira

Componentes	% p/p	
	Palha de Arroz	Poda de Oliveira
Celulose	35,1 ± 0,6	24,9 ± 0,5
Hemicelulose	25,9 ± 0,5	15,3 ± 0,1
Lignina total	18,4 ± 1,9	19,3 ± 0,1
Lignina insolúvel	13,3 ± 2,0	17,6 ± 0,1
Lignina solúvel	5,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Grupos acetil	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Cinzas	12,4 ± 0,3	3,4 ± 0,1
Extrativos	14,4 ± 0,8	27,1 ± 1,4
Aquoso	6,6 ± 0,2	23,3 ± 1,3
Alcoólico	8,4 ± 0,3	3,8 ± 0,1
TOTAL	107,7 ± 4,9	92,0 ± 1,1

Média de três determinações.

5.2. Obtenção e caracterização do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e de poda de oliveira

A composição química dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (HHPA) e poda de oliveira (HHPO), obtidos por catálise ácida conforme condições descritas no item 4.1.2, está apresentada na Tabela 5.2. Verifica-se uma separação seletiva entre as frações hemicelulósica e de celulignina, assim como variações nos teores de açúcares e compostos de degradação em função da matéria-prima e das condições de hidrólise empregada.

A Tabela 5.2 mostra que as concentrações de açúcares totais presentes nos HHPA e HHPO após tratamento ácido foram de 18,27 e 23,70 g/L, respectivamente. Nota-se ainda que a D-xilose (13,98 g/L) foi o açúcar predominante no HHPA e que sua concentração foi cerca de seis vezes maior do que a D-glicose e L-arabinose. Para o HHPO, as concentrações de D-xilose (9,31 g/L) e D-glicose (10,61 g/L) foram similares, porém,

superiores em três vezes a de L-arabinose. Segundo MATEO et al. (2012), a combinação de folhas e madeira provenientes da poda da oliveira, em uma proporção de 1:2 (m/m), gera um hidrolisado hemicelulósico com concentrações similares de D-glicose e D-xilose. No entanto, no hidrolisado obtido apenas das folhas da poda a concentração de D-xilose é superior ao de D-glicose e o contrario é observado no hidrolisado proveniente somente da madeira resultante da poda, ou seja, o hidrolisado apresenta maior teor de D-glicose do que de D-xilose.

Considerando que as frações hemicelulósicas da palha de arroz e da poda de oliveira no presente estudo corresponderam a 25,9 e 15,3% da matéria seca total, a recuperação da hemicelulose após processo de hidrólise ácida foi de aproximadamente 65 e 87% do total das pentosanas (D-xilose e L-arabinose), dos quais 67 e 77% se referem a D-xilose, respectivamente. De fato, o processo hidrolítico de biomassa vegetal empregando ácido diluído apresenta como principal característica a elevada eficiência em solubilizar D-xilose (> 65%), sendo o teor da pentose variável de acordo com a matéria-prima e as condições reacionais empregadas durante a hidrólise (ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2003).

Os hidrolisados hemicelulósicos também foram caracterizados quanto aos teores de ácido acético, furanos e compostos fenólicos, conforme mostrado na Tabela 5.2. Nota-se que a concentração destes compostos, os quais são consideravelmente tóxicos ao metabolismo microbiano, foram maiores no HHPO do que no HHPA, sugerindo assim, um maior grau de toxicidade do hidrolisado de poda de oliveira. Embora a concentração de ácido acético obtida no HHPO (1,56 g/L) tenha sido cerca de 30% superior ao observado no HHPA (2,19 g/L), estes valores correspondem à máxima concentração possível que poderiam ser obtidas com base nas quantidades de grupos acetil presentes nestas matérias-primas lignocelulósicas (Tabela 5.1). Estes resultados indicam que nas condições de hidrólise empregadas ocorreu completa solubilização do grupo acetil na forma de ácido acético.

Tabela 5.2 - Composição química parcial dos principais componentes presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (HHPA) e poda de oliveira (HHPO) obtidos por catálise ácida diluída

Componentes	Hidrolisados Hemicelulósicos	
	HHPA	HHPO
Carboidratos	Concentração (g/L)	
Açúcares Totais	18,27 ± 0,48	23,70 ± 0,51
D-glicose	2,20 ± 0,11	10,61 ± 0,22
D-xilose	13,98 ± 0,62	9,31 ± 0,15
L-arabinose	2,09 ± 0,09	3,78 ± 0,12
Ácido Alifático Fraco	Concentração (g/L)	
Ácido Acético	1,56 ± 0,07	2,19 ± 0,07
Furanos	Concentração (g/L)	
Furanos Totais ^a	0,57 ± 0,01	0,74 ± 0,04
5-hidroxi metilfurfural	0,130 ± 0,001	NA
Furfural	0,111 ± 0,001	NA
Ácido Furóico	0,234 ± 0,002	NA
Compostos Fenólicos	Concentração (g/L)	
Fenólicos Totais ^b	2,96 ± 0,10	3,62 ± 0,19
Vanilina	0,039 ± 0,001	NA
Ácido Vanílico	0,018 ± 0,001	NA
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,116 ± 0,002	NA
Ácido Ferúlico	0,112 ± 0,003	NA

^aMetodologia de Martinez et al. (2000); ^bMetodologia de Folin-Ciocalteu; NA (não analisado).

Com relação aos furanos, nota-se no HHPA a presença de produtos de degradação de D-glicose (5-HMF) e de D-xilose (furfural), bem como o ácido furóico (produto de oxidação destes furanos). Nota-se também que o ácido furóico (0,234 g/L) foi o maior componente furânico contido no HHPA, com praticamente o dobro do teor observado para

o 5-HMF (0,130 g/L) e furfural (0,111 g/L). Estes teores quando somados representa um total de 0,475 g/L de furanos, ou seja, 83% do valor verificado para os furanos totais. O restante deste valor pode ser atribuído aos produtos de degradação da lignina, uma vez que tais compostos apresentam pouca absorvidade na região de 280 nm, comprimento de onda o qual é quantificado a presença de furanos. Com base nas concentrações de 5-HMF e furfural encontrados no HHPA, pode-se inferir que a degradação de pentoses e hexoses foi de aproximadamente 7,8 e 1,1%, respectivamente, o que sugere baixa severidade do processo de hidrólise ácida deste material. Ainda em relação aos furanos, nota-se que o HHPO apresentou teor de furanos totais superior (23%) ao encontrado para o HHPA.

Dentre os compostos fenólicos de baixa massa molar presentes no HHPA (Tabela 5.2), as maiores concentrações (> 100 mg/L) foram observadas para os ácidos *p*-cumárico e ferúlico, seguidos da vanilina (39 mg/L) e do ácido vanílico (18 mg/L). Ainda em relação aos compostos provenientes da degradação da lignina, nota-se uma menor concentração de fenólicos totais no HHPA (2,96 g/L) quando comparado ao HHPO (3,62 g/L). Vale ressaltar ainda que a soma da concentração dos compostos fenólicos individuais contidos no HHPA representou 9,6% do valor verificado para os fenólicos totais no mesmo hidrolisado, o que sugere a presença de outros compostos fenólicos de baixa massa molar e/ou de estruturas polifenólicas, os quais não foram identificados.

A Tabela 5.3 mostra os níveis de açúcares, ácido acético, furanos e compostos fenólicos após a concentração dos hidrolisados de palha de arroz e poda de oliveira. Nota-se que os teores de açúcares, em ambos os hidrolisados, foram proporcionais aos fatores de concentração empregados, significando que não ocorreu degradação das pentoses e hexoses em quantidades consideráveis durante o processo de concentração. Porém, os demais componentes avaliados tiveram seus teores aumentados de acordo com o tipo de composto. Para o ácido acético, foi verificado um aumento de 1,5 e 2,5 vezes para o HHPAC e HHPOC, respectivamente, e o teor deste composto no HHPOC (5,4 g/L) foi praticamente o dobro do observado para o HHPAC (2,4 g/L). O maior aumento verificado no teor de ácido acético no HHPOC pode ser atribuído principalmente às condições empregadas na etapa de concentração, uma vez que, este composto apresenta ponto de ebulição, sob vácuo, inferior a temperatura empregada durante este processo (70°C), aumentando assim sua volatilidade (PERRY; GREEN, 1997).

Tabela 5.3 - Composição química parcial dos principais componentes presentes nos hidrolisados hemicelulósicos concentrados de palha de arroz (HHPAC) e poda de oliveira (HHPOC)

Componentes	Hidrolisados Hemicelulósicos Concentrados			
	HHPAC		HHPOC	
Carboidratos	Concentração (g/L)	FC	Concentração (g/L)	FC
Açúcares Totais	132,71 ± 0,20	7,3	121,01 ± 0,65	5,1
D-glicose	16,84 ± 0,10	7,7	52,62 ± 0,25	5,0
D-xilose	98,56 ± 0,04	7,1	48,82 ± 0,22	5,2
L-arabinose	17,31 ± 0,01	8,3	19,57 ± 0,46	5,2
Ácido Alifático Fraco	Concentração (g/L)	FC	Concentração (g/L)	FC
Ácido Acético	2,37 ± 0,01	1,52	5,40 ± 0,13	2,47
Furanos	Concentração (g/L)	FC	Concentração (g/L)	FC
Furanos Totais ^a	0,94 ± 0,01	1,65	1,29 ± 0,08	1,74
5-hidroximetilfurfural	0,706 ± 0,04	5,43	NA	-
Furfural	0,361 ± 0,002	3,25	NA	-
Ácido Furóico	1,37 ± 0,07	5,85	NA	-
Compostos Fenólicos	Concentração (g/L)	FC	Concentração (g/L)	FC
Fenólicos Totais ^b	11,67 ± 0,33	3,94	14,20 ± 0,40	3,92
Álcool Vanilil	0,104 ± 0,01	-	NA	-
Vanilina	0,084 ± 0,004	2,15	NA	-
Ácido Vanílico	0,106 ± 0,009	5,88	NA	-
Ácido Sirínico	0,044 ± 0,003	-	NA	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,193 ± 0,001	1,66	NA	-
Ácido Ferúlico	0,386 ± 0,001	3,44	NA	-

^aMetodologia de Martinez et al. (2000); ^bMetodologia de Folin-Ciocalteu; FC (fator de concentração); NA (não avaliado).

Os níveis de furanos totais presentes em ambos os hidrolisados foram aumentados em aproximadamente 1,7 vezes após processo de concentração, sendo constatado um teor de 0,94 g/L para o HHPAC e 1,29 g/L para o HHPOC. Quando avaliados individualmente os compostos furânicos presentes no HHPAC, verifica-se que os teores destes compostos foram aumentados entre 3,25 e 5,85 vezes. Estes resultados mostram que a volatilidade do furfural, sob vácuo, é superior ao do 5-HMF e ácido furóico, por isso apresentou um fator de concentração inferior.

A Tabela 5.3 mostra ainda um aumento de aproximadamente 3,9 vezes nos níveis de fenólicos totais em ambos os hidrolisados após processo de concentração, constatando um teor de 11,67 e 14,20 g/L para o HHPAC e HHPOC, respectivamente. Em relação aos compostos fenólicos de baixa massa molar quantificados no HHPAC, verifica-se que o fator de concentração para estes compostos foi bastante variável (de 1,66 a 5,88 vezes). Nota-se também a presença de álcool vanilil e ácido sirínico, os quais não foram verificados no hidrolisado de palha de arroz original. A diferença observada no fator de concentração destes compostos fenólicos está relacionada com a estrutura química de cada componente, uma vez que, de uma forma geral, a presença de grupos metoxilas no anel aromático diminui a solubilidade dos ácidos fenólicos (GRANT; LANGEVIN, 2002). Este fato explica, por exemplo, o menor fator de concentração observado para o ácido *p*-cumárico em relação aos demais ácidos fenólicos contidos neste hidrolisado.

O espectro de varredura na região do ultravioleta para os hidrolisados de palha de arroz e poda de oliveira (original e concentrado) foi realizado como uma análise complementar com o objetivo de confirmar o aumento nos teores dos compostos aromáticos após processo de concentração a vácuo destes hidrolisados. Este espectro fornece informações sobre os produtos de degradação de lignina e furanos, pois os compostos fenólicos apresentam seus máximos valores de absorbância em 220, 250 e 350 nm (SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2013a) e os furanos são absorvidos em 280 nm, uma vez que apenas uma pequena parte da lignina solúvel é quantificada neste comprimento de onda (MARTINEZ et al., 2000). A Figura 5.1 apresenta o espectro de varredura na região do ultravioleta dos hidrolisados de palha de arroz e de poda de oliveira, antes e após processo de concentração destes hidrolisados. Nota-se que ambos os hidrolisados apresentaram o maior valor de absorvidade no comprimento de onda em 220 nm, sendo o valor encontrado no HHPAC inferior ao encontrado para o HHPOC (71%).

Figura 5.1 - Espectro de varredura na região do ultravioleta dos hidrolisados hemicelulósicos de (A) palha de arroz (original: linha preta e concentrado: linha vermelha) e (B) poda de oliveira (original: linha azul e concentrado: linha laranja).

Ainda em relação aos comprimentos de onda característicos dos compostos fenólicos (250 e 300 nm), observa-se um aumento de aproximadamente 3,0 vezes nos valores de absorvidade após concentração a vácuo dos hidrolisados. Para o pico em 280 nm, característico dos furanos, o aumento verificado na absorbância foi de aproximadamente 2,5 vezes, independente do hidrolisado. Estes resultados confirmam os obtidos por análise cromatográfica, os quais apontam uma maior toxicidade do HHPOC em relação ao HHPAC.

5.3. Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e de poda de oliveira por *Pichia stipitis*

A fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foi avaliada através de cultivos de *Pichia stipitis* em hidrolisado concentrado com diferentes teores de açúcares totais, conforme apresentado na Figura 5.2.

As Figuras 5.2-A-D apresentam a cinética de consumo de D-glicose, D-xilose, L-arabinose e ácido acético por *Pichia stipitis*, respectivamente, quando empregados 80, 105 e 130 g/L de açúcares totais. Verifica-se que no meio contendo 80 g/L de açúcares, a levedura foi capaz de consumir completamente D-glicose e D-xilose, após 24 e 72 horas respectivamente, e que o ácido acético foi consumido juntamente com estes açúcares, sendo completamente esgotado do meio após 48 horas de cultivo. Vale ressaltar que em concentrações superiores a 80 g/L de açúcares totais no HHPA, a levedura não foi capaz de consumir D-glicose e D-xilose, e que independente da concentração de açúcares, a L-arabinose não foi consumida pela levedura.

Como esperado, o crescimento celular e a produção de etanol (Figuras 5.2-E e F, respectivamente), ocorreu apenas nas fermentações realizadas em hidrolisado de palha de arroz contendo 80 g/L de açúcares totais, atingindo seus valores máximos de 20 e 22 g/L respectivamente, após 72 horas de cultivo. Nesta condição o valor de produtividade volumétrica em etanol (Q_P) foi de 0,31 g/L.h, o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) de 0,33 g/g e o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) de 0,30 g/g.

Figura 5.2 - Consumo de (A) D-glicose, (B) D-xilose, (C) L-arabinose e (D) ácido acético, (E) crescimento celular e (F) produção de etanol quando cultivada a levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com concentrações de açúcares totais de 130 g/L (■), 105 g/L (●) e 80 g/L (▲).

O fato de *Pichia stipitis* não ter sido capaz de assimilar D-glicose e D-xilose, assim como de produzir etanol, quando cultivada em meio contendo teor de açúcar superior a 80 g/L pode estar associado aos níveis mais elevados de compostos tóxicos presentes nestas concentrações de hidrolisado. De fato, Roberto et al. (1991), estudando a produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de meio semissintético contendo D-xilose (20 a 145 g/L) verificaram que a levedura foi capaz de fermentar elevadas concentrações de D-xilose.

O perfil fermentativo de *Pichia stipitis* no hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira contendo aproximadamente 80 g/L de açúcares totais está apresentado na Figura 5.3. Verifica-se que a levedura foi capaz de consumir parcialmente D-glicose (30%) e ácido acético (23%), não sendo observado consumo de D-xilose e L-arabinose. Como consequência do pobre consumo de D-glicose, nota-se ainda, que a levedura apresentou baixo crescimento celular, não sendo capaz de produzir etanol.

Figura 5.3 - Consumo de D-glicose (■), D-xilose (■), L-arabinose (■) e ácido acético (■), crescimento celular (■) e produção de etanol (■) quando cultivada a levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira contendo 80 g/L de açúcares totais.

Estes resultados mostram que o hidrolisado de poda de oliveira é mais tóxico para a levedura *Pichia stipitis* do que o hidrolisado de palha de arroz, quando empregada as mesmas concentrações de açúcares totais (80 g/L). De fato, o resultado de caracterização

química do HHPOC apresentou maiores teores de ácido acético, furanos e compostos fenólicos quando comparado ao HHPAC, o que afetou negativamente o metabolismo fermentativo da levedura.

5.4. Biotransformação de compostos tóxicos por *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético e em hidrolisados hemicelulósicos

Considerando a baixa fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos contendo concentrações de açúcares totais superiores a 80 g/L, ensaios de biotransformação por *Saccharomyces cerevisiae* foram realizados em diferentes meios. Estes ensaios tiveram como objetivo avaliar o potencial da levedura em converter os compostos tóxicos presentes nestes meios em outros com menor grau de toxicidade para a levedura *Pichia stipitis*. Para isso foram empregadas as seguintes condições: 10 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*, pH 5,5 e fator de aeração de 5,0 ($V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$).

5.4.1. Meio sintético

O meio sintético empregado nesta etapa do trabalho mimetizou a concentração dos açúcares e compostos tóxicos presentes no HHPA (com 105 g/L de açúcares totais), sendo compostos por: D-glicose (12 g/L), D-xilose (80 g/L) e L-arabinose (12 g/L), adicionados de ácido acético (2,0 g/L), 5-HMF (500 mg/L), furfural (120 mg/L), vanilina (50 mg/L), ácido *p*-cumárico (120 mg/L) e ácido ferúlico (300 mg/L), empregados individualmente ou combinados.

O consumo dos açúcares, o crescimento celular e a formação de produtos metabólicos (etanol e glicerol) por *Saccharomyces cerevisiae*, na presença dos diferentes compostos tóxicos avaliados estão apresentados na Figura 5.4. Nota-se que o consumo de D-glicose foi completo após 2 horas de ensaio, independente do tipo de composto tóxico adicionado e que ambas as pentoses não foram assimiladas pela levedura (Figura 5.4-A). Com relação ao perfil de formação de biomassa e produtos metabólicos por *Saccharomyces cerevisiae* durante o biotratamento, verifica-se em todos os meios avaliados um pequeno crescimento celular (cerca de 2 g/L), com formação de aproximadamente 5,0 e 0,71 g/L de etanol e glicerol, respectivamente (Figura 5.4-B).

Figura 5.4 - (A) Consumo de açúcares e (B) formação de biomassa, etanol e glicerol por *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético contendo individualmente ácido acético (vermelho), 5-HMF (azul), furfural (verde), vanilina (preto), ácido ferúlico (laranja), ácido *p*-cumárico (amarelo) e em combinação (vinho).

A Figura 5.5 mostra o perfil de assimilação dos compostos tóxicos e a formação dos produtos de conversão destes compostos por *Saccharomyces cerevisiae*. Nota-se que dentre os compostos avaliados (individualmente), apenas o ácido acético não foi consumido pela levedura (Figura 5.5-A). Verifica-se também que o 5-HMF, furfural e vanilina foram completamente assimilados por *Saccharomyces cerevisiae*, porém, em diferentes tempos de biotransformação. Para os meios que foram adicionados de furfural ou vanilina (Figuras 5.5-C e D) este consumo foi em 1 hora, enquanto que, no meio contendo apenas 5-HMF (Figura 5.5-B) foram necessárias 4 horas de ensaio de biotransformação para que a levedura assimilasse completamente o composto. Nota-se ainda que, durante a assimilação dos furanos ocorreu a formação de ácido furóico, com uma concentração máxima de aproximadamente 50 e 80 mg/L, o que equivaleu a 11 e 31% da concentração inicial de 5-HMF e furfural, respectivamente. Estes resultados indicam que o ácido furóico não foi o produto preferencial da biotransformação dos furanos pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que apresentaram baixos teores. De fato, nos meios contendo apenas 5-HMF, além do ácido furóico, verificou-se também um pico cromatográfico com tempo de retenção de 2,4 minutos, sugerindo a formação de outro composto como produto de bioconversão deste furano.

De acordo com a literatura, o ácido furóico não é o principal produto de conversão de 5-HMF e furfural por *Saccharomyces cerevisiae*, sendo estes compostos preferencialmente convertidos em seus correspondentes álcoois (KOOPMAN et al., 2010; LIU, 2011). Por exemplo, Taherzadeh et al. (1999) ao cultivar *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 em meio contendo D-glicose (50 g/L) e furfural (2 g/L), verificaram que o maior produto de conversão do furano foi o álcool furfuril, seguido do ácido furóico, com concentrações inferiores a 1% em relação ao teor de furfural adicionado.

Conforme mencionado anteriormente, a vanilina foi completamente assimilada por *Saccharomyces cerevisiae* após 1 hora de ensaio, sendo observada a formação de álcool vanilil e ácido vanílico, com concentrações máximas de aproximadamente 40 e 5 mg/L, observadas após 4 e 2 horas de ensaio respectivamente (Figura 5.5-D). Estas concentrações quando somadas foram equivalentes a aproximadamente 85% do teor inicial de vanilina, indicando que outros produtos possam ter sido formados, porém, não foram identificados. Fitzgerald, Stratford e Narbad (2003), empregando *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo D-glicose (20 g/L) na presença de 150 mg/L de vanilina também observaram a produção de álcool vanilil como principal produto de conversão da vanilina, seguida do ácido vanílico.

Figura 5.5 - Perfil de assimilação dos principais compostos tóxicos avaliados individualmente e seus produtos de conversão por *Saccharomyces cerevisiae*.

Em relação aos ácidos hidroxicinâmicos (ácidos *p*-cumárico e ferúlico), nota-se que estes compostos foram pobremente assimilados por *Saccharomyces cerevisiae*. O perfil de assimilação do ácido *p*-cumárico mostrou-se lento, atingindo 26% de redução em seu teor após 8 horas de ensaio de biotransformação (Figura 5.5-E). Embora não tenha sido identificado qualquer produto de conversão do ácido *p*-cumárico nas condições cromatográficas empregadas foram detectados dois picos com tempos de retenção de 3,3 e 5,0 minutos, formados após 1 hora de ensaio. Vanbeneden et al. (2008) estudando a biotransformação de ácido *p*-cumárico por *Saccharomyces cerevisiae* verificaram a formação de 4-vinilfenol e 4-etilfenol como produtos de conversão deste ácido fenólico. Portanto, os picos cromatográficos verificados após a conversão do ácido *p*-cumárico poderiam corresponder a estes compostos.

Conforme apresentado na Figura 5.5-F, a concentração de ácido ferúlico (290 mg/L) decresceu para 240 mg/L após 8 horas de ensaio de biotransformação por *Saccharomyces cerevisiae*, com formação de 30 mg/L de álcool vanilil como único produto de conversão. Esta concentração de álcool vanilil correspondeu a 70% do máximo que poderia ser obtido a partir do teor inicial de ácido ferúlico, indicando a formação de outro produto de conversão do ácido ferúlico pela levedura. De acordo com a literatura, o 4-vinil-guaiacol tem sido identificado como o principal produto metabólico da conversão de ácido ferúlico por *Saccharomyces cerevisiae* (HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1993; VANBENEDEN et al., 2008). No entanto, o 4-vinil guaiacol é facilmente convertido a álcool vanilil, o que justificaria a presença deste composto no presente trabalho (MUKAI et al., 2010).

Nesta etapa foi avaliado também a biotransformação dos compostos tóxicos por *Saccharomyces cerevisiae* quando todos estes estavam presentes no meio (combinado), assim como seus produtos de conversão. A Figura 5.6-A mostra o perfil de assimilação do ácido acético na presença dos demais compostos avaliados. Nota-se que houve um aumento de 15% em sua concentração após 8 horas de ensaio, o que foi diferente do observado no meio contendo apenas este composto. Este aumento no teor de ácido acético verificado neste ensaio pode ser justificado pela presença de furanos (5-HMF e furfural), uma vez que a conversão destes compostos por *Saccharomyces cerevisiae* leva a um decréscimo na concentração de NADPH e como consequência um aumento nos níveis de acetato excretados ao meio (HEER; HEINE; SAUER, 2009).

Figura 5.6 - (A) Perfil de assimilação de ácido acético (■), 5-HMF (■), furfural (■), vanilina (■), ácido *p*-cumárico (■) e ácido ferúlico (■), (B) formação de ácido furóico (●), álcool vanilil (●) e ácido vanílico (●) e (C) espectro de varredura na região do ultravioleta durante tratamento biológico do meio sintético por *Saccharomyces cerevisiae*.

Ainda em relação à Figura 5.6-A, verifica-se que o 5-HMF, o furfural e a vanilina foram completamente assimilados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, porém, nestas condições a assimilação do 5-HMF ocorreu após 8 horas de ensaio de biotransformação. Este comportamento difere do observado para o ensaio contendo individualmente o 5-HMF, uma vez que foi necessário apenas 4 horas para a assimilação total deste composto pela levedura. Para o furfural e a vanilina foi verificado o mesmo tempo de assimilação do observado quando empregado individualmente tais compostos. Estes resultados indicam que o tempo de tratamento é um importante fator a ser considerado na bioconversão destes compostos por *Saccharomyces cerevisiae*.

Os resultados de biotransformação do 5-HMF e do furfural mostram ainda a formação de ácido furóico como único produto de conversão destes furanos (Figura 5.6-B). Nesta condição, a concentração de ácido furóico (13 mg/L) equivaleu a apenas 2% do teor total de furanos contidos inicialmente no meio, sendo este valor muito abaixo do observado quando empregado individualmente o 5-HMF ou furfural. Estes resultados mostram que o perfil de biotransformação destes furanos por *Saccharomyces cerevisiae* quando em presença de outros compostos apresentou-se de forma diferente do verificado quando fornecido individualmente o 5-HMF ou furfural, sugerindo assim, a formação de outros compostos como produtos de bioconversão destes furanos por *Saccharomyces cerevisiae*.

Nota-se também na Figura 5.6-B, que o álcool vanilil (41 mg/L) e o ácido vanílico (5,5 mg/L) foram os produtos de conversão da vanilina por *Saccharomyces cerevisiae*. Estes teores foram os mesmos dos observados nos ensaios contendo individualmente o composto, indicando que a presença de outros compostos fenólicos e/ou furânicos não altera o metabolismo da levedura.

Para os ácidos *p*-cumárico e ferúlico, a Figura 5.6-A mostra ainda que, a levedura foi capaz de assimilar pobremente estes compostos, com decréscimo de 15% em seus teores após 8 horas de ensaio. Este comportamento também foi observado quando fornecido individualmente estes ácidos fenólicos. Em relação aos produtos de conversão do ácido ferúlico, foi verificada a formação de álcool vanilil. É válido ressaltar que, nestas condições de biotransformação não foram verificados os picos cromatográficos com tempo de retenção de 3,3 e 5,0 minutos, observados nos ensaios contendo individualmente o ácido *p*-cumárico. Estes resultados sugerem ainda que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ter convertido o ácido *p*-cumárico em outros produtos metabólicos não identificados, ou ainda, consumido como fonte de carbono.

O espectro de varredura na região do ultravioleta do meio sintético contendo todos os compostos tóxicos avaliados, antes e após ensaios de biotransformação por *Saccharomyces cerevisiae* está apresentado na Figura 5.6-C. Dentre o intervalo de absortividade avaliado (200 a 500 nm), foram analisados três picos distintos nos comprimentos de onda de 220, 280 e 350 nm, os quais apresentaram os maiores valores de absorbância. Nota-se um decaimento de aproximadamente 26% no valor da absortividade no comprimento de onda de 350 nm, na primeira hora de ensaio, permanecendo este valor constante até o final do processo. Para o comprimento de onda em 280 nm, nota-se um decaimento de 37% no valor de absorbância na primeira hora de tratamento, sendo constatada ao final do processo uma redução de 76%. Diferente do observado nestes comprimentos de onda, a absortividade em 220 nm foi aumentada em aproximadamente 31% após 8 horas de ensaio de biotransformação por *Saccharomyces cerevisiae*. Estes resultados corroboram com os observados para as análises cromatográficas, mostrando que o maior decaimento no teor dos ácidos fenólicos foi verificado na primeira hora de ensaio de biotransformação e que os aldeídos furânicos foram assimilados gradualmente pela levedura. De acordo com Liu (2011), a região de 220 nm é caracterizada pela absortividade de diversos álcoois aromáticos (LIU, 2011), e o aumento verificado na absorbância neste comprimento de onda é justificado pela presença de álcool vanilil como produto de bioconversão da vanilina e/ou ácido ferúlico por *Saccharomyces cerevisiae*.

5.4.2. Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz

O hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz contendo 105 g/L de açúcares totais foi submetido ao tratamento biológico por *Saccharomyces cerevisiae* visando avaliar o perfil de assimilação dos compostos tóxicos presentes neste meio pela levedura em diferentes tempos. Conforme apresentado na Figura 5.7, durante o biotratamento a levedura foi capaz de consumir completamente a D-glicose após 6 horas de ensaio, enquanto que ambas as pentoses permaneceram inalteradas. Neste período ocorreu a formação de 6,9 e 2,0 g/L de etanol e glicerol, respectivamente.

Figura 5.7 - (A) Consumo de açúcares, (B) ácido acético e (C) formação de produtos metabólicos por *Saccharomyces cerevisiae* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. D-glicose (■), D-xilose (■), L-arabinose (■), etanol (■) e glicerol (■).

A Figura 5.8 apresenta o perfil de assimilação de ácido acético, furanos e compostos fenólicos e o espectro de varredura na região do ultravioleta durante o tratamento do hidrolisado de palha de arroz pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, assim como os produtos desta bioconversão. Nota-se que o ácido acético não foi consumido pela levedura, sendo observado um aumento de aproximadamente 40% em sua concentração após 10 horas de tratamento (Figura 5.8-A). Como discutido anteriormente, o aumento observado no teor de ácido acético deve-se à presença de furfural e 5-HMF no meio de biotransformação. De fato, como verificado nos ensaios em meio sintético, o teor de ácido acético apresentou-se inalterado quando fornecido individualmente, porém, em meio contendo todos os compostos tóxicos avaliados, houve um aumento em sua concentração após 8 horas de ensaio de biotransformação por *Saccharomyces cerevisiae*.

Em relação aos furanos, nota-se na Figura 5.8-B que a levedura foi capaz de assimilar quase que completamente o 5-HMF e furfural (> 90%) e apenas baixos níveis de ácido furóico (9%) foram observados nas primeiras horas de ensaio. Nota-se ainda que, após este período ocorreu um aumento na concentração de ácido furóico. Esta variação verificada no teor de ácido furóico está associada ao fato do composto ser formado como um dos produtos de conversão de 5-HMF e furfural por *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 5.8 – Assimilação de (A) ácido acético, (B) furanos, (C) compostos fenólicos e (D) espectro de varredura na região do ultravioleta durante o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*. 5-HMF (●), furfural (●), ácido furóico (●), vanilina (▲), álcool vanilil (▲), ácido vanílico (▲), ácido siríngico (▲), ácido *p*-cumárico (▲) e ácido ferúlico (▲).

Nota-se na Figura 5.8-C que a assimilação dos compostos fenólicos por *Saccharomyces cerevisiae* foi incompleta e variável. Observa-se para a vanilina, por exemplo, que sua concentração foi reduzida em aproximadamente 60%, enquanto que para os ácidos *p*-cumárico e ferúlico a assimilação foi de apenas 20 e 15%, respectivamente. Em relação ao ácido siríngico, nota-se que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não foi capaz de assimilar o composto, porém, foi verificado um aumento de 31 e 87% no teor de ácido vanílico e álcool vanilil. O aumento na concentração destes compostos está relacionado

com a conversão de vanilina por *Saccharomyces cerevisiae*, conforme verificado também para os ensaios de biotransformação em meio sintético.

A Figura 5.8-D apresenta o espectro de varredura na região do ultravioleta do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz durante o tratamento por *Saccharomyces cerevisiae*. Nota-se que a maior redução de absorbância para os comprimentos de onda a 280, 320 e 350 foi verificada após 6 horas de biotratamento, com uma queda de aproximadamente 35% no valor de absorvidade.

Os resultados referentes às reduções nos compostos tóxicos por *Saccharomyces cerevisiae* em hidrolisado de palha de arroz alcançados no presente estudo estão dentro da faixa de variação reportada na literatura para o mesmo hidrolisado, porém, para diferentes métodos de destoxificação. Por exemplo, Silva, Carneiro e Roberto (2013a) verificaram que os teores de furanos foram reduzidos em aproximadamente 50% ao destoxificarem em diferentes condições o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregando processo oxidativo avançado. Em outro estudo, Mussatto e Roberto (2001) verificaram reduções nas concentrações de fenólicos totais entre 18 e 33% quando empregado carvão ativado no tratamento de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

5.4.3. Hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira

O perfil de assimilação dos açúcares e compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira (HHPO), durante o tratamento biológico com *Saccharomyces cerevisiae* está apresentado na Figura 5.9. Nota-se que a levedura foi capaz de consumir 47% de D-glicose, após 18 horas de ensaio, não sendo observado neste período consumo dos demais açúcares contidos neste hidrolisado. Verifica-se também que durante a assimilação destes açúcares, ocorreu baixa produção de etanol (4,6 g/L) e de glicerol (0,95 g/L).

Em relação ao ácido acético, nota-se um aumento de aproximadamente 13% na concentração deste composto ao final do biotratamento (Figura 5.9-B). Este aumento também foi observado nos ensaios de biotransformação em meio sintético e em hidrolisado de palha de arroz, decorrente da presença de furfural e compostos fenólicos nestes meios. De fato, neste ensaio foi verificado decréscimo no teor de furanos e fenólicos totais de aproximadamente 50 e 10%, respectivamente, o que poderia diminuir os níveis de NADPH e consequentemente aumentar os teores de acetato excretados ao meio (Figura 5.9-B).

Figura 5.9 – (A) Consumo de D-glicose (■), D-xilose (■) e L-arabinose (■), formação de etano (■) e glicerol (■), (B) assimilação de ácido acético (●), furanos (●) e fenólicos (●) e (C) varredura espectral na região do ultravioleta durante o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira por *Saccharomyces cerevisiae*.

A Figura 5.9-C apresenta o espectro de varredura na região do ultravioleta nos diferentes tempos de tratamento do hidrolisado de poda de oliveira. Verifica-se que o maior decréscimo no valor de absorbância para toda a região estudada (200 a 50 nm) foi de aproximadamente 25%, verificados após 12 horas de tratamento biológico.

Quando comparados os resultados do presente trabalho com os observados para outros métodos de destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira, verifica-se que as reduções nas concentrações de furanos e fenólicos encontraram-se dentro da faixa reportada na literatura. Mateo et al. (2013), ao destoxificarem hidrolisado de poda de oliveira por alteração de pH (empregando CaO para elevar o pH até 10), verificaram reduções de 56% nos teores de furanos totais. No mesmo estudo, tratando este hidrolisado com acetato de etila, os autores verificaram uma remoção mais acentuada de furfural (94%) e fenólicos totais (49%). Em outro trabalho, Díaz et al. (2009) verificaram uma redução de 47% na concentração de furfural ao tratarem o hidrolisado de poda de oliveira por alteração de pH.

Um ponto positivo observado no presente estudo foi a pequena perda de açúcares fermentescíveis durante o tratamento biológico com *Saccharomyces cerevisiae*, tendo em vista que, em geral, as diferentes estratégias de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos normalmente utilizados, acarretam em perdas consideráveis nas concentrações de açúcares, o que pode comprometer a viabilidade do processo. Carvalho et al. (2005), avaliando o tratamento de destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por um sistema combinado de carvão ativado e resina de troca iônica, observaram reduções de 40% no teor de D-xilose. Em outro estudo, Mussatto, Santos e Roberto (2004), avaliando o processo de destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por sistemas de adsorção em carvão ativado, observaram que as reduções nas concentrações de açúcares variaram entre 4 e 18%.

Os resultados apresentados nesta etapa do trabalho permitem concluir que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de assimilar os principais compostos tóxicos avaliados, independente do meio de biotransformação. Além disso, considerando que o tempo foi uma importante variável observada nas modificações químicas destes meios, se faz necessário avaliar a fermentabilidade por *Pichia stipitis* em cada tempo do tratamento biológico avaliado.

5.5. Efeito do tempo de tratamento biológico do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis*

Nesta etapa foi avaliado o efeito do tempo do tratamento biológico do hidrolisado de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae* sobre a fermentabilidade deste meio por *Pichia stipitis*. Para melhor compreensão do texto, os ensaios foram nomeados de acordo com as diferentes condições de tempo de biotratamento: hidrolisado não-tratado (HT₀) e hidrolisado biotratado por 2 horas (HT₂), 4 horas (HT₄), 6 horas (HT₆), 8 horas (HT₈) e 10 horas (HT₁₀).

A Figura 5.10 apresenta o consumo de açúcares e a formação de biomassa e etanol por *Pichia stipitis* após os diferentes tempos de tratamento do hidrolisado de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*. Vale ressaltar que a concentração inicial de D-glicose variou de acordo com o tempo de biotratamento, uma vez que, durante esta etapa, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* assimilou este açúcar.

Nota-se que para o hidrolisado não-tratado não ocorreu consumo de açúcares (D-glicose e D-xilose) por *Pichia stipitis* e que após o tratamento biológico a levedura foi capaz de consumir completamente a D-glicose residual (proveniente do biotratamento) nos ensaios TH₂ e TH₄, após 24 e 48 horas de fermentação respectivamente. Além disso, no ensaio TH₂ foi verificado consumo de 12% de D-xilose e no ensaio TH₄, 27% desta pentose foi consumida por *Pichia stipitis*. Estes resultados mostram que embora tenha sido observado um baixo consumo de D-xilose e que um elevado tempo foi necessário para a levedura consumir a D-glicose, o tratamento biológico empregado conseguiu reduzir a toxicidade do hidrolisado.

Verifica-se na Figura 5.10-B que à medida que o tempo de tratamento biológico do hidrolisado foi aumentado para 6, 8 e 10 horas (HT₆, HT₈ e HT₁₀), o consumo de D-xilose por *Pichia stipitis* foi de 57, 40 e 51%, respectivamente. Estes resultados indicam que acima de 6 horas de biotratamento não há favorecimento de consumo de D-xilose pela levedura *Pichia stipitis*, portanto, é o tempo limite de tratamento biológico do hidrolisado de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae* nas condições avaliadas no presente estudo.

Figura 5.10 - (A) Consumo de D-glicose, (B) D-xilose, (C) L-arabinose, (D) crescimento celular e (E) produção de etanol por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, submetidos à biotratamento por *Saccharomyces cerevisiae*. HT₀ (■), HT₂ (●), HT₄ (▲), HT₆ (▼), HT₈ (▲) e HT₁₀ (▴).

De fato, as Figuras 5.10-D e E mostram que durante o cultivo de *Pichia stipitis* em HT₆ foi obtida a maior produção de biomassa e de etanol, que atingiram valores máximos de 8,6 e 8,9 g/L, respectivamente. Vale ressaltar ainda que em tempos menores de tratamento do hidrolisado de palha de arroz (HT₂ e HT₄), a levedura *Pichia stipitis* apresentou fase de adaptação de aproximadamente 24 horas, o que indica que nestas condições de tempo o hidrolisado ainda apresentava-se com elevado grau de toxicidade.

De um modo geral, o tratamento do hidrolisado por *Saccharomyces cerevisiae* levou a aumentos no consumo de açúcares, no crescimento celular e na produção de etanol, bem como redução na fase de latência da levedura *Pichia stipitis*, porém, em alguns casos, sem sua eliminação. O emprego de diversas estratégias de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos acarreta em consideráveis melhoras na fermentabilidade destes hidrolisados por *Pichia stipitis*, entretanto, mesmo após tais tratamentos também são observados períodos de latência nos perfis fermentativos da levedura, o que provavelmente esteja associado à presença de compostos potencialmente tóxicos que não foram totalmente removidos durante o tratamento (NIGAM, 2002; SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2013).

Os parâmetros fermentativos do cultivo de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para os diferentes tempos de biotratamento avaliados estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (HHPA) após diferentes tempos de tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*

Tempo de Biotratamento do HHPA	Parâmetros Fermentativos de <i>Pichia stipitis</i>		
	Y _{X/S} (g/g)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)
HT ₀	0,0	0,0	0,0
HT ₂	0,11	0,0	0,0
HT ₄	0,21	0,15	0,041
HT ₆	0,16	0,18	0,086
HT ₈	0,20	0,12	0,042
HT ₁₀	0,12	0,14	0,060

HT₀ (hidrolisado não-tratado), HT₂, HT₄, HT₆, HT₈ e HT₁₀ (hidrolisado biotratado por 2, 4, 6, 8, e 10 horas respectivamente). Y_{X/S} (fator de conversão de substrato em células), Y_{P/S} (fator de conversão de substrato em etanol) e Q_P (produtividade volumétrica em etanol).

Os resultados referentes aos parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* apresentados na Tabela 5.4 estão de acordo com o perfil assimilativo de açúcares e a formação de biomassa e etanol por *Pichia stipitis*, uma vez que para o ensaio HT₆ foram verificados os maiores valores de $Y_{P/S}$ (0,18 g/g) e Q_P (0,08g g/L.h), quando comparado aos demais meios avaliados.

Definida a condição de tempo do biotratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz que apresentou melhorias na fermentação de *Pichia stipitis*, foram realizados também ensaios fermentativos com *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira (HHPO) e em meio semissintético (MS) biotratados nestas condições.

As Figuras 5.11 e 5.12 apresentam o perfil de consumo de açúcares e a formação de biomassa e etanol por *Pichia stipitis* em HHPO e MS, respectivamente. Nota-se que para ambos os meios avaliados o biotratamento favoreceu a fermentabilidade de *Pichia stipitis*. Em relação ao HHPO verifica-se um período de adaptação da levedura *Pichia stipitis* de aproximadamente 48 horas, com o consumo de D-glicose e D-xilose iniciado somente após este tempo, os quais foram consumidos simultaneamente (Figura 5.11-A). Nota-se ainda que no hidrolisado biotratado, após este período de adaptação, a levedura consumiu completamente a hexose e 52% de D-xilose. Neste mesmo intervalo de tempo, no hidrolisado não-tratado o consumo de D-glicose foi de apenas 24%, não sendo observado consumo de D-xilose pela levedura *Pichia stipitis*. Além disso, não foi verificado consumo de L-arabinose, em ambos os hidrolisados. De acordo com Liu et al. (2004), estudando o efeito do furfural (1,0 a 11,0 g/L) sobre o metabolismo fermentativo de *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, o consumo de D-glicose somente foi iniciado após a levedura converter o furano em álcool furfuril, contornando assim a toxicidade do meio.

Como consequência do biotratamento do HHPO, verifica-se uma concentração celular e produção de etanol por *Pichia stipitis* de 6,1 e 7,1 g/L, respectivamente, alcançados após 96 horas de fermentação (Figura 5.11-B). Nestas condições os valores dos parâmetros fermentativos para o hidrolisado tratado foram de 0,14 g/g para o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e de 0,06 g/L.h para a produtividade volumétrica em etanol (Q_P).

Figura 5.11 - (A) Consumo de D-glicose (■), D-xilose (■), L-arabinose (■), (B) crescimento celular (●) e produção de etanol (●) por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira. Hidrolisado não-tratado (símbolo aberto) e hidrolisado previamente tratado com *Saccharomyces cerevisiae* por 6 horas (símbolo fechado).

O tratamento biológico do meio semissintético mimetizando as concentrações dos principais componentes em açúcares e compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (com 105 g/L de açúcares totais) foi também avaliado. Vale ressaltar que, para uma melhor comparação e discussão dos resultados, nos meios com e sem os inibidores não foram adicionados D-glicose, uma vez que durante o biotratamento a levedura *Saccharomyces cerevisiae* consumiu completamente este açúcar.

A Figura 5.12 mostra que a levedura *Pichia stipitis* consumiu completamente a D-xilose nos meios sem a presença dos inibidores e biotratado, com produção máxima de células e etanol de aproximadamente 15 e 20 g/L, respectivamente. No entanto, verifica-se que para alcançar estes máximos valores de concentração celular e etanol nos ensaios em meio biotratado, a levedura necessitou de um maior período de tempo. Nos ensaios fermentativos em meio contendo todos os inibidores (não-tratado), a levedura consumiu 72% de D-xilose, com crescimento celular e produção de etanol de aproximadamente 11 g/L, verificados após 72 horas de ensaios fermentativo.

Nota-se na Figura 5.12-C que a presença dos inibidores impactou mais fortemente o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) do que a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) de *Pichia stipitis*. Verifica-se valores de $Y_{P/S}$ entre 0,21 e 0,28 g/g e de Q_P entre 0,16 e 0,38 g/L.h, com os maiores valores destes parâmetros observados no meio sem a presença dos compostos tóxicos. Os valores de Q_P para o meio semissintético contendo os inibidores (não tratado) e biotratado por 6 horas por *Saccharomyces cerevisiae*, apresentaram um decréscimo de 60 e 40% respectivamente, quando comparado aos valores obtidos nos ensaios em meio semissintético sem a presença dos compostos tóxicos. Estes resultados sugerem que o hidrolisado de palha de arroz apresenta em sua composição outros compostos potencialmente tóxicos ao metabolismo de *Pichia stipitis*, uma vez que a levedura não foi capaz de consumir D-xilose e produzir etanol em hidrolisado não-tratado.

O comportamento fermentativo de *Pichia stipitis* em MS contendo todos os compostos tóxicos (sem tratamento) foi semelhante ao observado para o HHPO. Nesta condição, também foi verificado que a levedura necessitou de um período de adaptação às condições adversas do meio fermentativo, para enfim iniciar o consumo de D-xilose e a produção de etanol e células.

Figura 5.12 - (A) Consumo de D-xilose (quadrado) e L-arabinose (circulo), (B) crescimento celular (triângulo) e produção de etanol (estrela) e (C) parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis*. Sem compostos tóxicos não-tratado (preto), com compostos tóxicos não-tratado (vermelho) e biotratado com *Saccharomyces cerevisiae* por 6 horas (azul).

Para efeito de comparação, alguns parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis*, observados nos diferentes meios avaliados, estão sumarizados na Tabela 5.5. Nota-se que o tratamento biológico de todos os meios apresentou um efeito positivo sobre estes parâmetros. Por exemplo, verifica-se que a produtividade volumétrica em etanol no MS biotratado apresentou um valor de aproximadamente 40% superior quando comparado com o MS contendo os inibidores (sem tratamento).

Tabela 5.5 – Análise comparativa dos parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* quando cultivada em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (HHPA) e de poda de oliveira (HHPO) e em meio semissintético (MS) tratados por 6 horas com *Saccharomyces cerevisiae* nas seguintes condições: 10 g/L de células, pH 5,5 e fator de aeração 5,0

Meios avaliados		$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)
MS	Sem inibidores não-tratado	0,22	0,28	0,38
	Com inibidores não-tratado	0,19	0,21	0,16
	Biotratado	0,16	0,23	0,23
HHPA	Não-tratado	0	0	0
	Biotratado	0,16	0,18	0,09
HHPO	Não-tratado	0,07	0	0
	Biotratado	0,13	0,14	0,06

A Tabela 5.5 mostra também que o biotratamento dos hidrolisados de palha de arroz e de poda de oliveira por 6 horas empregando *Saccharomyces cerevisiae* forneceu um meio com menor grau de toxicidade, o qual permitiu melhorar a fermentabilidade destes hidrolisados por *Pichia stipitis*. No entanto, os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* nestes hidrolisados foram inferiores aos valores observados para o meio semissintético contendo os inibidores (sem tratamento).

De forma geral, pode-se concluir que o tratamento biológico dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz e de poda de oliveira empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 6 horas pode ser considerado promissor, porém, estudos adicionais são ainda necessários para melhorar a fermentabilidade destes hidrolisados por *Pichia stipitis*.

5.6. Efeito da concentração de *Saccharomyces cerevisiae*, pH e aeração no tratamento biológico do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis*

Nesta etapa foi utilizado um planejamento fatorial composto com face centrada para avaliar quantitativamente o efeito de cada variável estudada (concentração de *Saccharomyces cerevisiae*, pH e fator de aeração) no tratamento biológico de hidrolisado de palha de arroz sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis*.

A realização desta etapa do trabalho consistiu em submeter o hidrolisado de palha de arroz (contendo 105 g/L de açúcares totais) a um tratamento com *Saccharomyces cerevisiae* por 6 horas, variando a concentração celular de 5 a 15 g/L, pH de 3,0 a 8,0 e fator de aeração de 3,5 a 6,5 ($V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$), conforme matriz apresentada na Tabela 5.6. O hidrolisado obtido em cada condição experimental foi fermentado por *Pichia stipitis* para avaliar o impacto do tratamento biológico sobre o processo fermentativo desta levedura.

O perfil de consumo de açúcares, assim como a formação de células e etanol por *Pichia stipitis* após as diferentes condições de biotratado do hidrolisado de palha de arroz, estão apresentados nas Figuras 5.13 e 5.14, respectivamente. Nestas figuras são mostrados também os perfis de fermentação em hidrolisado não-tratado. Diante do grande número de ensaios e para uma melhor compreensão dos dados, estes foram divididos em três grupos, separados de acordo com o pH inicial empregado na etapa anterior de biotratamento do hidrolisado.

De uma forma geral, nota-se na Figura 5.13 que todas as condições do planejamento favoreceram o consumo de D-glicose e D-xilose nas fermentações de *Pichia stipitis*, não sendo verificado consumo destes açúcares no hidrolisado não-tratado. Observa-se também que a D-glicose foi completamente consumida do meio em todos os casos avaliados, sendo o tempo de consumo deste açúcar dependente de sua concentração inicial, uma vez que em determinadas condições de tratamento do hidrolisado a levedura *Saccharomyces cerevisiae* também foi capaz de consumir a hexose.

Tabela 5.6 – Condições do planejamento experimental fatorial composto 2^3 com face centrada e quadruplicata no ponto central

Ensaio	Níveis codificados			Níveis reais		
	Biomassa (X ₁)	pH (X ₂)	Aeração (X ₃)	Biomassa (g/L)	pH	Aeração (V _{frasco} /V _{meio})
01	-1	-1	-1	5,0	3,0	3,5
02	+1	-1	-1	15,0	3,0	3,5
03	-1	+1	-1	5,0	8,0	3,5
04	+1	+1	-1	15,0	8,0	3,5
05	-1	-1	+1	5,0	3,0	6,5
06	+1	-1	+1	15,0	3,0	6,5
07	-1	+1	+1	5,0	8,0	6,5
08	+1	+1	+1	15,0	8,0	6,5
09	-1	0	0	5,0	5,5	5,0
10	+1	0	0	15,0	5,5	5,0
11	0	-1	0	10,0	3,0	5,0
12	0	+1	0	10,0	8,0	5,0
13	0	0	-1	10,0	5,5	3,5
14	0	0	+1	10,0	5,5	6,5
15 (PC)	0	0	0	10,0	5,5	5,0
16 (PC)	0	0	0	10,0	5,5	5,0
17 (PC)	0	0	0	10,0	5,5	5,0
18 (PC)	0	0	0	10,0	5,5	5,0

PC: ponto central.

Em relação a D-xilose, verifica-se que o consumo desta pentose por *Pichia stipitis* nos hidrolisados biotratados situou-se dentro da faixa de 38 a 83%. Para os hidrolisados previamente tratados em pH 3,0 (Figura 5.13-D), a porcentagem de consumo de D-xilose pela levedura foi superior a 60%, com exceção do ensaio 01, o qual apresentou o menor consumo observado. Vale ressaltar que neste ensaio, todas as variáveis avaliadas durante o tratamento biológico foram empregadas em seus níveis mínimos. Nestas condições de pH (empregado durante o tratamento biológico) o maior consumo de D-xilose (77%) por *Pichia stipitis* foi observado no ensaio 05, o qual apresentou a maior produção de etanol (16 g/L) e crescimento celular (9,3 g/L), quando comparado a todos os outros ensaios realizados nesta etapa do trabalho. As condições de biotratamento empregadas no ensaio 05 foram: 5,0 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*, pH 3,0 e fator de aeração de 6,5. Para os demais ensaios deste grupo (tratamento em pH 3,0) os teores de etanol encontraram-se entre 6,9 e 12,3 g/L (Figura 5.14-D).

A Figura 5.13-E mostra que o consumo de D-xilose por *Pichia stipitis* em hidrolisado previamente tratado em pH 5,5 encontrou-se dentro da faixa de 44 a 65%. Nestas condições foram verificadas crescimento celular entre 4,3 e 6,9 g/L (Figura 5.14-B) e produção máxima de etanol entre 3,9 e 8,2 g/L (Figura 5.14-E), observados após 72 horas de fermentação. É importante ressaltar que estas concentrações de etanol são referentes ao álcool produzido durante fermentação de *Pichia stipitis*.

O maior consumo de D-xilose (entre 70 e 83%) por *Pichia stipitis* foi verificado nos ensaios empregando o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz previamente tratado em pH 8,0, com exceção do ensaio 12, que apresentou um consumo de apenas 46% (Figura 5.14-F). Nesta condição foi verificado produção de etanol na faixa de 8,3 e 10,2 g/L, sendo verificado para o ensaio 12 a formação de apenas 2,3 g/L do álcool (Figura 5.14-F). Nota-se ainda na Figura 5.14-C que o crescimento da levedura em todos os ensaios deste grupo encontrou-se abaixo do maior crescimento observado (ensaio 05 - tratado em pH 3,0).

Analizando os parâmetros fermentativos nas diferentes condições avaliadas, nota-se na Figura 5.15 que os valores de produtividade volumétrica em etanol (Q_P) sofreram grandes variações (0,042 a 0,157 g/L.h), o que demonstra que as diferentes condições de tratamento empregadas tiveram influência sobre este parâmetro.

Figura 5.13 - Consumo de D-glicose (A, B e C) e D-xilose (D, E e F) nas fermentações de *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado (HNT - estrela) e biotratado por *Saccharomyces cerevisiae* nas diferentes condições do planejamento experimental: tratamento realizado em pH 3,0 (A e D - quadrado), pH 5,5 (B e E - círculo) e pH 8,0 (C e F - triângulo).

Figura 5.14 - Crescimento celular (A, B e C) e produção de etanol de *Pichia stipitis* (D, E e F) quando cultivada a levedura em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado (HNT - estrela) e biotratado por *Saccharomyces cerevisiae* nas diferentes condições do planejamento experimental: tratamento realizado em pH 3,0 (A e D - quadrado), pH 5,5 (B e E - círculo) e pH 8,0 (C e F - triângulo).

Os maiores valores de Q_P (aproximadamente 0,15 g/L.h) foram alcançados nos ensaios 05 e 11. Com relação ao fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$), verifica-se que este parâmetro apresentou pouca variação (0,12 a 0,23 g/g), com exceção do ensaio 12, o qual foi observado o menor valor para $Y_{P/S}$ (0,09 g/g). Nota-se ainda que, para todos os ensaios do planejamento, foram verificados valores de Q_P e $Y_{P/S}$ superiores ao observado para o hidrolisado não-tratado, uma vez que a levedura *Pichia stipitis* não foi capaz de fermentar este meio.

Figura 5.15 - (A) Produtividade volumétrica em etanol e (B) fator de conversão de substrato em etanol verificados nas fermentações com *Pichia stipitis* em hidrolisado não tratado (HNT) e tratado por *Saccharomyces cerevisiae* nas diferentes condições proposto pelo planejamento experimental.

5.6.1. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, os parâmetros fermentativos ($Y_{P/S}$ e Q_P) de *Pichia stipitis* foram analisados como respostas, conforme apresentado na Tabela 5.7. Os resultados referentes aos teores de açúcares e de compostos de degradação da biomassa vegetal (furanos e fenólicos), presentes ou formados durante o metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* em função do tratamento realizado, encontram-se apresentados no Apêndice A.

Tabela 5.7 – Parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* após 72 horas de fermentação utilizando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz submetidos as diferentes condições de biotratamento com *Saccharomyces cerevisiae* de acordo com planejamento fatorial

Ensaio	Níveis Reais			Parâmetros Fermentativos	
	X ₁	X ₂	X ₃	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)
E01	5,0	3,0	3,5	0,20	0,089
E02	15,0	3,0	3,5	0,20	0,106
E03	5,0	8,0	3,5	0,18	0,110
E04	15,0	8,0	3,5	0,18	0,101
E05	5,0	3,0	6,5	0,20	0,154
E06	15,0	3,0	6,5	0,22	0,129
E07	5,0	8,0	6,5	0,14	0,074
E08	15,0	8,0	6,5	0,14	0,078
E09	5,0	5,5	5,0	0,18	0,103
E10	15,0	5,5	5,0	0,15	0,074
E11	10,0	3,0	5,0	0,23	0,157
E12	10,0	8,0	5,0	0,09	0,042
E13	10,0	5,5	3,5	0,13	0,063
E14	10,0	5,5	6,5	0,14	0,072
E15*	10,0	5,5	5,0	0,12	0,056
E16*	10,0	5,5	5,0	0,13	0,054
E17*	10,0	5,5	5,0	0,12	0,061
E18*	10,0	5,5	5,0	0,14	0,071

*Ponto central. X₁ (concentração de *Saccharomyces cerevisiae*); X₂ (pH inicial) e X₃ (fator de aeração).

As estimativas dos efeitos, erro-padrão e teste t de *Student* para as respostas avaliadas ($Y_{P/S}$ e Q_P) encontram-se na Tabela 5.8. Nota-se que para a resposta $Y_{P/S}$, o fator principal pH (X_2) e o termo quadrático da concentração de *Saccharomyces cerevisiae* (X_1^2) apresentaram efeitos significativos ao nível de 90% de confiança, sendo o efeito do pH negativo, o que indica que o tratamento biológico do hidrolisado de palha de arroz em baixos valores de pH resultou em um hidrolisado com melhor fermentabilidade, e que ainda, o termo quadrático da concentração celular afetou positivamente esta resposta.

Tabela 5.8 - Efeitos estimados das variáveis significativas no nível de 90% de confiança para o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) de acordo com planejamento fatorial proposto

Variável Resposta	Fonte	Efeito	Erro-padrão	$t(8)$	p
$Y_{P/S}$ (g/g)	Média	0,131786	0,009704	13,58039	0,000001
	X_1	-0,002000	0,015601	-0,12820	0,901158
	X_2	-0,064000	0,015601	-4,10229	0,003427
	X_3	-0,010000	0,015601	-0,64098	0,539458
	X_1^2	0,057857	0,029971	1,93046	0,089656
	X_2^2	0,047857	0,029971	1,59680	0,148976
	X_3^2	-0,002143	0,029971	-0,07150	0,944756
	X_1X_2	-0,005000	0,017443	-0,28666	0,781660
	X_1X_3	0,005000	0,017443	0,28666	0,781660
	X_2X_3	-0,025000	0,017443	-1,43328	0,189678
Variável Resposta	Fonte	Efeito	Erro-padrão	$t(8)$	P
Q_P (g/L.h)	Média	0,066095	0,008930	7,40173	0,000076
	X_1	-0,008400	0,014356	-0,58512	0,574596
	X_2	-0,046000	0,014356	-3,20423	0,012533
	X_3	0,007600	0,014356	0,52939	0,610903
	X_1^2	0,033619	0,027579	1,21902	0,257560
	X_2^2	0,055619	0,027579	2,01673	0,078456
	X_3^2	-0,008381	0,027579	-0,30389	0,768965
	X_1X_2	0,000750	0,016051	0,04673	0,963876
	X_1X_3	-0,007250	0,016051	-0,45170	0,663481
	X_2X_3	-0,036750	0,016051	-2,28964	0,051294

Significativo a 90% de confiança (vermelho). X_1 (concentração de *Saccharomyces cerevisiae*); X_2 (pH inicial) e X_3 (fator de aeração).

Verifica-se ainda na Tabela 5.8 que o fator principal pH (X_2) também apresentou efeito negativo e significativo para a resposta Q_p . Além disso, foi observado para esta resposta que o termo quadrático do pH (X_2^2), assim como sua interação com a aeração (X_2X_3) também foram significativos ao nível de 90% de confiança.

Visando simplificar o modelo sem afetar o ajuste do mesmo foi realizada uma nova análise de variância (ANOVA) eliminando os termos não significativos. Desta forma, foram eliminados o termo quadrático da aeração (X_3^2) e as interações de primeira ordem entre a concentração celular e pH (X_1X_2) e entre a concentração celular e aeração (X_1X_3). Os resultados desta análise estão mostrados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados sobre o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_p) de *Pichia stipitis*

Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Y_{P/S}$ (g/g)	X_1	0,00001	1	0,00001	0,0221	0,88444	0,04
	X_2	0,01024	1	0,01024	22,6596	0,00059	39,24
	X_3	0,00025	1	0,00025	0,5532	0,47259	1,19
	X_1^2	0,00253	1	0,00253	5,5908	0,03752	9,68
	X_2^2	0,00172	1	0,00172	3,8039	0,07707	6,59
	X_2X_3	0,00125	1	0,00125	2,7661	0,12448	4,79
	Erro	0,00497	11	0,00045	-	-	-
$R^2 = 0,81$	Total	0,02609	17	-	-	-	-
Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
Q_p (g/L.h)	X_1	0,00012	1	0,00018	0,4538	0,51444	0,94
	X_2	0,00529	1	0,00529	13,6093	0,00357	28,31
	X_3	0,00014	1	0,00014	0,3715	0,55457	0,77
	X_1^2	0,00073	1	0,00073	1,8724	0,19849	3,90
	X_2^2	0,00215	1	0,00215	5,5259	0,03844	11,50
	X_2X_3	0,00270	1	0,00270	6,9490	0,02315	14,46
	Erro	0,00428	11	0,00039	-	-	-
$R^2 = 0,77$	Total	0,01868	17	-	-	-	-

X_1 (concentração de *Saccharomyces cerevisiae*); X_2 (pH inicial) e X_3 (fator de aeração). SQ (soma quadrática); GL (graus de liberdade); MQ (média quadrática). Significativo a 90% de confiança (vermelho).

Nesta nova análise de variância, os efeitos foram confirmados e o ajuste não foi alterado. Verifica-se na Tabela 5.9 que o fator principal pH (X_2) foi o que apresentou maior contribuição para ambas as respostas avaliadas, com 39,24 e 28,31% para o $Y_{P/S}$ e Q_P , respectivamente. De fato, estes resultados confirmaram os efeitos sugeridos pela análise direta dos dados, ou seja, que o fator principal pH (X_2) exerceu efeito significativo sobre os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis*, e este efeito foi negativo, ou seja, ambas as respostas avaliadas ($Y_{P/S}$ e Q_P) foram favorecidas quando tratado o hidrolisado de palha de arroz nos menores níveis de pH (3,0), com pouca influência dos demais fatores avaliados.

À partir destes dados foi elaborada então, uma análise de variância de regressão para os modelos representativos de ambas as variáveis respostas avaliadas ($Y_{P/S}$ e Q_P), sendo os resultados apresentados na Tabela 5.10. Nota-se que os coeficientes de correlação (R^2) foram de 0,81 para o $Y_{P/S}$ e de 0,77 para o Q_P e que o modelo foi altamente significativo ($p < 0,005$), não apresentando falta de ajuste ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.10 - Análise de variância de regressão para os modelos representativos das respostas referentes a fermentação por *Pichia stipitis* do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz previamente tratado

Variável Resposta	Fonte	SQ	GL	MQ	F	p
$Y_{P/S}$ (g/g)	Modelo	0,0210	6	0,00350	7,79	0,0019
	Resíduo	0,0050	11	0,00045	-	-
	Falta de Ajuste	0,0047	8	0,00059	6,40	0,0772
	Erro Puro	0,0003	3	0,00009	-	-
$R^2 = 0,81$	Total	0,026	17	-	-	-
Variável Resposta	Fonte	SQ	GL	MQ	F	p
Q_P (g/L.h)	Modelo	0,0140	6	0,00240	6,18	0,0048
	Resíduo	0,0043	11	0,00039	-	-
	Falta de Ajuste	0,0041	8	0,00051	8,89	0,0496
	Erro Puro	0,0002	3	0,00006	-	-
$R^2 = 0,77$	Total	0,019	17	-	-	-

Significativo a 95% de confiança (vermelho).

Com base nos dados obtidos da análise de variância, os modelos matemáticos para descrever o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e a produtividade volumétrica em etanol (Q_P), na região em estudo, são apresentados nas Equações 5.1 e 5.2, respectivamente (X_1 = concentração de *Saccharomyces cerevisiae*, X_2 = pH e X_3 = fator de aeração).

$$Y_{P/S} = 0,13 - 0,001X_1 - 0,032X_2 - 0,005X_3 + 0,029X_1^2 + 0,024X_2^2 - 0,012X_2X_3 \quad (5.1)$$

$$Q_P = 0,065 - 0,004X_1 - 0,023X_2 + 0,004X_3 + 0,015X_1^2 + 0,026X_2^2 - 0,018X_2X_3 \quad (5.2)$$

À partir destas equações foram geradas as curvas de nível para os modelos obtidos, relacionando o fator principal concentração de *Saccharomyces cerevisiae* (biomassa) e pH, mantendo-se a aeração fixa em cada nível estudado, uma vez que este fator não apresentou influência sobre as respostas (Figura 5.16). Nota-se que o ponto de máximo não correspondeu aos melhores valores de fermentação. De fato, o biotratamento realizado em pH 3,0 combinado com baixas ou altas concentrações de biomassa permitiram os maiores valores para ambas as respostas avaliadas ($Y_{P/S}$ e Q_P), independente do fator de aeração.

De forma a correlacionar a redução do nível de cada composto tóxico presente no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (5-HMF, furfural, vanilina, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico) sobre os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis*, foi realizada análise estatística visando a máxima redução destes compostos como resposta (Apêndice B). À partir dos modelos obtidos foram geradas curvas de nível relacionando o fator principal biomassa e pH, mantendo-se o fator de aeração fixo (6,5), visando maximizar a redução nos teores destes compostos (Figura 5.17). Nota-se que as maiores reduções nos teores destes compostos foram obtidas em condições diferentes das observadas na maximização de $Y_{P/S}$ e Q_P .

Verifica-se que, a maior redução no teor de 5-HMF pode ser obtida quando o hidrolisado de palha de arroz foi biotratado em pH 8,0 e altas concentrações de biomassa. Para o furfural e a vanilina, as maiores reduções foram verificadas na faixa de pH de 6,0 a 8,0, independente da concentração de *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 5.16 – Curvas de nível descritas pelo modelo que representa o (A, B e C) fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) e (D, E e F) a produtividade volumétrica em etanol (Q_p) após fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz previamente tratado conforme as diferentes condições do planejamento. Para todos os casos o fator de aeração foi mantido fixo: 3,5 (A e D), 5,0 (B e E) e 6,5 (C e F).

Figura 5.17 - Curvas de nível descritas pelo modelo que representa a máxima redução na concentração de (A) 5-HMF, (B) furfural, (C) vanilina, (D) ácido p-cumárico e (E) ácido ferúlico durante tratamento biológico por *Saccharomyces cerevisiae*. Para todos os casos o fator de aeração foi mantido fixo em seu nível máximo (6,5).

Em relação aos ácidos fenólicos, as Figuras 5.17-D e E mostram que as condições que melhor favoreceram a redução na concentração destes compostos foram mais próximas das observadas para as condições otimizadas para os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis*, uma vez que a redução nos teores de ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico foram maiores quando biotratado o hidrolisado hemicelulósico em baixos valores de pH, porém, com elevadas concentrações celulares.

A Tabela 5.11 sumariza os valores de $Y_{P/S}$ e Q_P obtidos nas condições de biotratamento que favorecem maiores redução nos teores dos furanos e compostos fenólicos. Verifica-se que as maiores remoções destes compostos não proporcionaram os máximos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P , porém, as baixas reduções verificadas nas concentrações dos ácidos fenólicos já foram suficientes para proporcionar valores mais próximos aos sugeridos pelos modelos matemáticos.

Tabela 5.11 – Máxima redução verificada nos teores dos compostos tóxicos avaliados e a influência desta redução nos valores dos parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis*

Compostos	Máxima redução (%)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)
5-HMF	96	0,15	0,08
Furfural	98	0,15	0,07
Vanilina	74	0,14	0,07
Ácido <i>p</i>-cumárico	23	0,19	0,10
Ácido Ferúlico	18	0,21	0,12

Estes resultados sugerem que a produção de etanol por *Pichia stipitis* não é favorecida com a remoção total destes compostos, uma vez que durante o tratamento biológico nas diferentes condições propostas, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ter apresentado comportamento metabólico diferente em relação aos compostos tóxicos avaliados, podendo assim, em determinados casos, converter tais compostos em outros com maior toxicidade à levedura *Pichia stipitis*. Tal comportamento difere do observado para outras estratégias de destoxificação química e/ou física de hidrolisados hemicelulósicos, uma vez que a literatura reporta que as maiores reduções nos teores destes

componentes gera um hidrolisado que proporciona uma maior produção de etanol por leveduras fermentativas (GE et al., 2011; SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2013a).

A otimização da produção de etanol por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz submetido às diferentes condições de tratamento biológico foi efetuada com auxílio do programa estatístico *Design-Expert* (método numérico). Para tal análise, as respostas ($Y_{P/S}$ e Q_P) foram maximizadas em conjunto, sendo as variáveis independentes e as porcentagens de redução nos teores dos compostos tóxicos mantidas na faixa de estudo. À partir desta análise foram sugeridas 5 soluções numéricas indicando o nível de cada variável e a resposta correspondente, conforme apresentado na Tabela 5.12. Nota-se que a solução 1 foi àquela que mostrou maiores valores de $Y_{P/S}$ e Q_P . Diante destes resultados, os modelos gerados para as respostas fermentativas avaliadas sugerem, nas condições onde tais respostas foram maximizadas (concentração de *Saccharomyces cerevisiae* - 5,0 g/L, pH - 3,0 e fator de aeração - 6,5), valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de $0,226 \pm 0,024$ g/g e $0,156 \pm 0,024$ g/L.h, respectivamente, além de reduções nos teores de 5-HMF (7,1%), furfural (18,2%), vanilina (2,1%), ácido *p*-cumárico (12,2%) e ácido ferúlico (6,1%).

Tabela 5.12 – Soluções numéricas das condições otimizadas de acordo com os critérios adotados

Solução	X_1	X_2	X_3	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	Redução (%)				
						HMF	Fur	Van	HCu	HFe
1	5,0	3,01	6,50	0,22	0,156	7,1	18,2	2,1	12,3	6,1
2	15,0	3,00	6,50	0,22	0,148	17,4	33,0	5,0	20,3	15,5
3	7,5	3,00	6,50	0,20	0,143	11,4	22,4	4,0	13,9	8,0
4	5,0	3,17	5,15	0,21	0,131	13,2	17,3	5,2	5,2	9,1
5	9,9	3,00	6,50	0,19	0,137	14,5	26,1	5,0	5,0	10,1

X_1 (biomassa em g/L), X_2 (pH), X_3 (fator de aeração baseado na razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$), $Y_{P/S}$ (fator de conversão de substrato em etanol), Q_P (produtividade volumétrica em etanol), HMF (5-HMF), Fur (furfural), Van (vanilina), HCu (ácido *p*-cumárico) e HFe (ácido ferúlico).

Visando confirmar os modelos obtidos, foi realizado o tratamento biológico do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz nas condições otimizadas e a composição deste hidrolisado antes e após o biotratamento encontra-se apresentada na Tabela 5.13. Nota-se que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não foi capaz de consumir os açúcares e o ácido acético, não sendo produzido etanol e apenas a formação de baixos níveis de glicerol (0,66 g/L). Em relação aos compostos aromáticos identificados, verifica-se que os teores de ácido furóico, vanilina e ácido sirínico mantiveram-se os mesmos após biotratamento do hidrolisado e que para os demais compostos o nível de seus teores dentro da faixa proposta para os modelos que maximizam os valores dos parâmetros fermentativos avaliados.

Tabela 5.13 - Composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado antes e após tratamento biológico por *Saccharomyces cerevisiae* nas melhores condições de biotratamento sugeridas pelos modelos matemáticos

Componentes	Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz		
	Original	Biotratado	Redução (%)
	Concentração (g/L)		
D-glicose	13,55 ± 0,25	13,19 ± 0,37	0
D-xilose	79,91 ± 1,24	80,20 ± 2,93	0
L-arabinose	10,63 ± 0,32	10,75 ± 0,47	0
Ácido Acético	1,85 ± 0,03	1,83 ± 0,06	0
Glicerol	0	0,66 ± 0,01	-
Etanol	0	0	0
5-HMF	0,525 ± 0,003	0,453 ± 0,005	13,7
Furfural	0,264 ± 0,003	0,206 ± 0,001	22,0
Ácido Furóico	1,05 ± 0,01	1,07 ± 0,01	0
Vanilina	0,056 ± 0,0001	0,057 ± 0,0003	0
Álcool Vanilil	0,093 ± 0,001	0,056 ± 0,001	40,0
Ácido Vanílico	0,095 ± 0,0002	0,079 ± 0,0003	36,0
Ácido Sirínico	0,034 ± 0,0001	0,033 ± 0,0002	0
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,143 ± 0,002	0,128 ± 0,001	10,5
Ácido Ferúlico	0,337 ± 0,001	0,318 ± 0,003	6,0

Com a finalidade de se avaliar a influência do biotratamento do hidrolisado de palha de arroz sobre o comportamento fermentativo da levedura *Pichia stipitis*, foram empregados hidrolisados tratados por *Saccharomyces cerevisiae* nas condições maximizadas (otimizadas). Na Figura 5.18 estão apresentados os perfis cinéticos de consumo dos açúcares, crescimento celular e produção de etanol por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz biotratado por 6 horas. Observa-se que a levedura foi capaz de consumir completamente a D-glicose, após 48 horas de ensaio, e parcialmente a D-xilose (67%), com formação de 8,8 g/L de células e produção de etanol de 13,5 g/L. Ainda em relação ao consumo de açúcares, apesar de verificar a presença de L-arabinose neste hidrolisado, os dados relativos ao consumo do açúcar não serão apresentados, uma vez que o mesmo não foi utilizado pela levedura nas condições fermentativas realizadas.

Figura 5.18 - Consumo de D-glicose (■) e D-xilose (■), crescimento celular (■) e formação de etanol (■) por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz submetidos ao tratamento nas seguintes condições: concentração de *Saccharomyces cerevisiae* (5,0 g/L), pH (3,0) e fator de aeração (6,5).

Nestas condições foram obtidos valores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) de 0,24 g/g e 0,153 g/L.h, respectivamente, calculados após 72 horas de ensaio fermentativo. Estes resultados mostram que o modelo descreve bem a região em estudo, uma vez que tais resultados estão dentro da faixa de variação prevista por este mesmo modelo ($Y_{P/S} = 0,226 \pm 0,024$ g/g e $Q_P = 0,156 \pm 0,024$ g/L.h).

Estes resultados encontram-se próximos à faixa de valores de $Y_{P/S}$ e Q_P reportados para as fermentações de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Pichia stipitis* após diferentes métodos de destoxificação (CARNEIRO, 2011; SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2013a). Carneiro (2011) empregando diferentes estratégias de adaptação de *Pichia stipitis* em hidrolisado de palha de arroz contendo as mesmas concentrações de açúcares fermentescíveis empregadas no presente estudo, encontraram valores de Q_P e $Y_{P/S}$ de aproximadamente 0,17 g/L.h e 0,16 g/g, respectivamente, com produção máxima de etanol de 11,8 g/L, observados após 72 horas de ensaio fermentativo. Em outro estudo também empregando altas concentrações de açúcares, Silva, Carneiro e Roberto (2013a) verificaram que as diferentes condições de tratamento do hidrolisado de palha de arroz por processos oxidativos avançados proporcionou valores de $Y_{P/S}$ na faixa de 0,27 a 0,38 g/g e Q_P de 0,02 a 0,36 g/L.h.

5.7. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (biotratado) por *Pichia stipitis* em biorreator de bancada

Nesta etapa do trabalho foi avaliado o perfil fermentativo de *Pichia stipitis*, em biorreator de bancada, empregando hidrolisado não-tratado (HNT) e biotratado por *Saccharomyces cerevisiae* nas melhores condições propostas pelo planejamento experimental (5,0 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*, pH 3,0, fator de aeração de 6,5 por um período de 6 horas), conforme mostrado na Figura 5.19. Todos os ensaios foram conduzidos com um coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio de 14 h^{-1} . Nota-se que na fermentação realizada com o hidrolisado biotratado (HBT), a levedura *Pichia stipitis* foi capaz de consumir completamente de D-glicose e D-xilose após 20 e 44 horas de cultivo, respectivamente. Com relação à fermentação empregando HNT, o consumo completo de D-glicose pela levedura se deu após 38 horas de cultivo, sendo observado no final do processo um consumo de 49% de D-xilose.

Figura 5.19 - (A) Consumo de açúcares, (B) crescimento celular e (C) produção de etanol por *Pichia stipitis* nos ensaios empregando hidrolisado de palha de arroz não tratado (linha vermelha) e biotratado por *Saccharomyces cerevisiae* por 6 horas.

Com relação ao crescimento da levedura *Pichia stipitis*, a Figura 5.19-B mostra uma fase de adaptação de aproximadamente 24 horas no ensaio realizado com o HNT, enquanto que no ensaio realizado com o HBT, a levedura foi capaz de crescer logo no início da fermentação, apresentado um comportamento diáuxico após esgotamento da D-glicose e início do consumo de D-xilose (após 24 horas de fermentação). A concentração celular máxima (18,6 g/L) observada no crescimento de *Pichia stipitis* em HBT se deu após 48 horas de cultivo, o qual após este período de tempo a levedura entrou em fase de latência, verificando também um declínio na biomassa formada após 88 horas de ensaio fermentativo. Este valor de crescimento celular representa 3 vezes o valor máximo observado na formação de células em HNT.

A fase de latência observada no ensaio empregando o HNT corresponde a uma fase de adaptação da levedura à presença dos compostos tóxicos presentes no meio, como por exemplo, os aldeídos aromáticos. De acordo com Liu et al. (2004), durante a fase lag de crescimento de algumas leveduras, incluindo *Pichia stipitis*, estas convertem os aldeídos aromáticos em suas formas reduzidas e/ou oxidadas (álcoois e/ou ácidos), de forma a contornar a toxicidade do hidrolisado.

O comportamento diáuxico da levedura *Pichia stipitis* quando em presença de D-glicose e D-xilose tem sido reportado na literatura, uma vez que a presença da hexose no meio fermentativo reprime algumas enzimas, entre elas D-xilose-redutase, assim como o transporte de outros açúcares, como, por exemplo, D-xilose (SLINIGER et al., 2011).

A Figura 5.21-C mostra que após 44 horas de cultivo em hidrolisado biotratado, a produção de etanol por *Pichia stipitis* foi de 23 g/L, enquanto no ensaio com HNT, foi alcançada uma concentração de apenas 11,7 g/L do álcool, observado após 96 horas de cultivo. Estes resultados confirmam que o tratamento do hidrolisado de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae* contribuiu para uma maior fermentabilidade do meio, visto que a levedura *Pichia stipitis* apresentou um aumento de aproximadamente 96% na máxima concentração de etanol produzida.

Na Tabela 5.14 estão apresentados os parâmetros fermentativos referentes às fermentações por *Pichia stipitis* em hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz biotratado e não-tratado. Para efeito comparativo, também foram realizados ensaios em frascos agitados.

Tabela 5.14 - Parâmetros fermentativos dos ensaios realizados em biorreator de bancada com hidrolisado não tratado (HNT) e hidrolisado biotratado (HBT)

Parâmetros Fermentativos	Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz			
	Frascos Agitados		Biorreator	
	HNT	HBT*	HNT	HBT
Tempo de fermentação (h)	96	96	96	44
D-glicose inicial (g/L)	12,7	11,9	12,7	11,9
D-xilose inicial (g/L)	74,9	72,1	74,9	72,1
Consumo de D-glicose (%)	100	100	100	100
Consumo de D-xilose (%)	49	87	49	100
Concentração celular inicial (g/L)	1,1	1,2	1,1	1,2
Máxima concentração celular (g/L)	5,9	10,5	6,3	18,6
Máxima concentração de etanol (g/L)	11,5	21,5	11,7	23,0
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,10	0,12	0,10	0,21
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,23	0,29	0,24	0,27
Q_X (g/L.h)	0,05	0,10	0,05	0,39
Q_P (g/L.h)	0,12	0,22	0,12	0,52
η (%)	45	57	47	53

*Calculados após 44 horas de cultivo. $Y_{X/S}$ (fator de conversão de substrato em células), $Y_{P/S}$ (fator de conversão de substrato em etanol), Q_X (produtividade volumétrica em células), Q_P (produtividade volumétrica em etanol) e η (eficiência do bioprocessos).

Com relação aos parâmetros fermentativos, obtidos nas fermentações dos hidrolisados biotratado e não-tratado, em biorreator e em frascos agitados, nota-se que, de um modo geral, os valores de Q_P , Q_S e $Y_{X/S}$ variaram com o meio de cultivo, enquanto que o $Y_{P/S}$ apresentou uma menor variação, encontrando-se na faixa de 0,23 a 0,29 g/g. Nota-se ainda que, nas fermentações em hidrolisado não-tratado (HNT) os valores de todos os parâmetros fermentativos foram similares nos cultivos de *Pichia stipitis*, tanto em biorreator quanto em frascos agitados, e que estes parâmetros foram melhorados após tratamento biológico do hidrolisado, independente da forma de condução empregada durante a etapa fermentativa.

Nas fermentações em hidrolisado biotratado (HBT), as diferenças observadas nos parâmetros fermentativos quando comparados os cultivos em biorreator e em frascos agitados, podem estar provavelmente relacionadas às diferenças na disponibilidade do oxigênio, que é uma condição ambiental capaz de afetar fortemente estes parâmetros. Ao comparar o $Y_{P/S}$ obtidos nos hidrolisados avaliados, verifica-se uma diferença de 2,4 vezes nos valores destes parâmetros, com exceção dos ensaios realizados em HBT conduzido em biorreator, o qual apresentou um valor superior de $Y_{P/S}$ de apenas 1,3 vezes em relação ao valor observado para o $Y_{X/S}$. Isto significa que as condições de disponibilidade de oxigênio desviaram parte do fluxo de carbono para a produção de células, sugerindo então que, maiores concentrações de etanol podem ser obtidas ao diminuir o valor de K_{La} . De fato, Silva et al. (2012) avaliando o efeito da transferência de oxigênio (K_{La}) sobre os parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis* em meio semissintético a base de D-glicose, D-xilose e L-arabinose, quando conduzidas as fermentações em biorreator de bancada, verificaram que o aumento no valor de K_{La} (0,7 a 65,8 h⁻¹) proporcionou um favorecimento na formação de células em detrimento a produção de etanol. Desta forma o emprego de condições mais adequadas de transferência de oxigênio em biorreator para a fermentação do hidrolisado biotratado poderia proporcionar melhores parâmetros fermentativos.

Os resultados fermentativos por *Pichia stipitis*, em biorreator de bancada observados no presente estudo apresentaram-se compatíveis aos obtidos após diferentes métodos de tratamento de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregando concentrações de açúcares fermentescíveis de aproximadamente 100 g/L (CARNEIRO 2011, SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2013b). De acordo com Carneiro (2011), a produção de etanol por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 em fermentador de bancada adotando um K_{La} de aproximadamente 10 h⁻¹, a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de

arroz foi favorecida após estratégia de adaptação da levedura neste hidrolisado. O autor verificou que a estratégia biológica empregada proporcionou um aumento de 50% no valor de Q_P , quando comparado ao observado para o hidrolisado não-tratado, sendo verificados valores próximos de $Y_{P/S}$ em ambos os meios (aproximadamente 0,30 g/g). Quando comparado estes resultados com os observados no presente estudo, verifica-se que o método biológico de tratamento de hidrolisado de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae* proporcionou um aumento de aproximadamente 3 vezes no valor de Q_P , não sendo observado diferenças consideráveis nos valores de $Y_{P/S}$.

Em outro estudo, Silva, Carneiro e Roberto (2013a) avaliaram o perfil fermentativo de *Pichia stipitis* em hidrolisado de palha de arroz previamente tratado por processo oxidativo avançado, quando conduzidas as fermentações em biorreator de bancada (K_{La} de 5 h^{-1}). Os autores verificaram que o tratamento proporcionou melhoras nos parâmetros fermentativos de *Pichia stipitis*, alcançando após 84 horas de fermentação um valor de Q_P de 0,21 g/L.h e de $Y_{P/S}$ de 0,29 g/g. Assim como verificado no estudo de Carneiro (2011), o método de tratamento empregado no presente estudo apresentou valor de Q_P superior (2,5 vezes) ao reportado por Silva, Carneiro e Roberto (2013a), porém, os valores de $Y_{P/S}$ apresentaram-se próximos.

É importante ressaltar também, que no presente estudo foram empregadas elevadas concentrações de açúcares fermentescíveis (aproximadamente 100 g/L) e que os parâmetros fermentativos alcançados em cultivo de *Pichia stipitis* em hidrolisado biotratado, foram equivalentes aos reportados na literatura para outros tipos de tratamento, porém, com concentrações de açúcares totais inferiores a 60 g/L (NIGAM, 2002; TELLI-OKUR; EKEN-SARAÇOGLU, 2008; ZHU et al., 2010; CHANDEL et al., 2011). De acordo com Gírio et al. (2010), o emprego de hidrolisados hemicelulósicos com concentrações de açúcares na faixa de 80 a 100 g/L é imprescindível para uma elevada obtenção de etanol no meio fermentativo, o que viabilizaria economicamente a etapa de destilação do álcool.

De uma forma geral, as condições do biotratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregadas no presente estudo, proporcionaram ganhos na produtividade volumétrica em etanol, eficiência no consumo de açúcares, bem como na máxima concentração de etanol obtida, o que demonstra que este tratamento foi capaz de melhorar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, reduzindo desta forma

o efeito inibitório dos compostos tóxicos presentes neste meio. Além disso, os resultados obtidos nas fermentações dos hidrolisados tratados por *Saccharomyces cerevisiae* em frascos agitados, foram equivalentes aos alcançados por técnicas convencionais de destoxificação, como discutido anteriormente, o que demonstra a eficiência do método empregado.

6. CONCLUSÕES

O tratamento de hidrólise ácida da palha de arroz e dos resíduos da poda de oliveira promoveu a obtenção de hidrolisados hemicelulósicos ricos em açúcares fermentescíveis, com diferentes proporções entre D-glicose e D-xilose, bem como entre os teores dos componentes tóxicos.

O hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira apresentou-se mais tóxico do que o hidrolisado de palha de arroz, uma vez que os teores de ácido acético, furanos totais e fenólicos totais foram 29, 23 e 22% superiores aos obtidos para a palha de arroz.

Os hidrolisados de palha de arroz e de poda de oliveira apresentaram elevada toxicidade para a levedura *Pichia stipitis*, inibindo completamente seu crescimento quando empregado os hidrolisados concentrados com teores de açúcares totais superiores a 105 e 80 g/L, respectivamente.

Os ensaios de biotransformação dos hidrolisados, assim como do meio sintético, empregando *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que as modificações na composição destes meios foram dependentes do tempo de tratamento, porém este parâmetro foi dependente do meio avaliado. A levedura atuou de forma seletiva, convertendo preferencialmente os furanos e compostos fenólicos, não sendo verificada variação considerável nos teores de açúcares.

Durante os ensaios de biotransformação a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de consumir D-glicose com baixas produções de etanol, glicerol e ácido acético, sem consumir D-xilose e L-arabinose.

No hidrolisado de palha de arroz e no meio sintético (contendo todos os compostos tóxicos) a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de assimilar 90% de 5-HMF e furfural, sendo verificados baixos teores de ácido furóico como produto de conversão. A vanilina foi completamente assimilada pela levedura na primeira hora de ensaio de biotransformação em meio sintético, porém, em hidrolisado de palha de arroz foi constatado um residual do composto (42%), mesmo após 10 horas de ensaio de biotransformação, tendo em ambos os casos o álcool vanilil como principal produto de conversão, seguido pelo ácido vanílico em baixas concentrações. Além disso, nestes meios a levedura converteu parcialmente os ácidos ferúlico (15%) e *p*-cumárico (20%), com formação de álcool vanilil observado apenas como produto de conversão do ácido ferúlico.

O biotratamento do hidrolisado de poda de oliveira por *Saccharomyces cerevisiae* por 18 horas proporcionou uma redução parcial nos teores de furanos totais (47%) e de fenólicos totais (11%), não sendo identificados produtos de conversão.

A fermentação de hidrolisado de palha de arroz submetido a tratamento biológico por 6 horas permitiu o consumo de 57% de D-xilose por *Pichia stipitis* e produção de etanol de 9 g/L ($Y_{P/S} = 0,18$ g/g e $Q_P = 0,086$ g/L.h).

Os resultados da fermentação do hidrolisado de palha de arroz por *Pichia stipitis* mostraram que o tratamento biológico por 6 horas, empregando 10 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*, pH 5,5 e fator de aeração de 5,0, favoreceu o consumo de D-xilose (57%) e a produção de etanol (9 g/L). A fermentação do hidrolisado de poda de oliveira por *Pichia stipitis* apresentaram valores inferiores nos parâmetros fermentativos ($Y_{P/S} = 0,14$ g/g e $Q_P = 0,060$ g/L.h) quando comparados ao hidrolisado de palha de arroz, sugerindo um maior grau de toxicidade deste hidrolisado.

Os ensaios fermentativos de *Pichia stipitis* em meio semissintético mostraram também que o biotratamento deste meio por 6 horas favoreceu o consumo de D-xilose e a produção de etanol em aproximadamente 40%, quando comparado com o meio semissintético contendo todos os compostos tóxicos sem o tratamento biológico.

O pH empregado no biotratamento apresentou forte efeito sobre os parâmetros bioquímicos da fermentação de hidrolisado de palha de arroz por *Pichia stipitis*, sendo os melhores resultados fermentativos obtidos em pH 3,0.

As melhores condições de biotratamento por *Saccharomyces cerevisiae* foram alcançadas empregando 5 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*, pH 3,0 e fator de aeração de 6,5 ($V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$).

Nas condições otimizadas do biotratamento do hidrolisado de palha de arroz, a fermentação em biorreator de bancada empregando uma taxa de transferência de oxigênio (K_{La}) de aproximadamente 14 h^{-1} proporcionou aumentos de aproximadamente 79, 21 e 333% nas taxas de consumo de açúcares, $Y_{P/S}$ e Q_P de *Pichia stipitis*, respectivamente, quando comparados ao hidrolisado não-tratado.

O tratamento biológico dos hidrolisados hemicelulósicos empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma técnica promissora capaz de diminuir o grau de toxicidade destes meios com consequente melhoria em sua fermentabilidade.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J.; BHAT, S.G. Permeabilization of baker's yeast with N-lauroyl sarcosine. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 1367-1435, 2008.
- AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1515-1524, 2008.
- AGBOGBO, F.K.; WENGER, K.S. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 34, p. 723-727, 2007.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 309-318, 2002.
- AKTAS, N.; TANYOLAÇ, A. Kinetics of laccase-catalyzed oxidative polymerization of catechol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 61-69, 2003.
- ALMEIDA, J.R.M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 340-349, 2007.
- APHA AWWA. **Standard Methods for examination of water and wastewater** 550B, 17th edition. New York : American Public Association, 1989.
- AZEVEDO, M.S.; SANTOS, R.V.O.; MAGALHÃES, T.V. Produção de etanol no Brasil. **Revista de Divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v. 2, n. 1, p. 151-154, 2012.
- BAEL, S-C.; KWON, Y-J. Optimization of the pretreatment of rice straw hemicellulosic hydrolyzates for microbial production of xylitol. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, p. 404-409, 2007.
- BANERJEE, N., BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, R. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 226-228, 1981.

BAQUEIRO-PEÑA, I.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G.; GONZÁLEZ-ZAMORA, E.; AUGUR, C.; LOERA, O.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4721-4724, 2010.

BASTOS, V.D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, n 25, p. 5-38, 2007.

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.

BROWNING, B.L. **Methods of wood chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1967.

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.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 161, p. 84-92, 2010.

CÁNOVAS, M.; TORROGLOSA, T.; IBORRA, J.L. Permeabilization of *Escherichia coli* cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 300-308, 2005.

CARA, C.; ROMERO, I.; OLIVEIRA, J.M.; SÁEZ, F.; CASTRO, E. Liquid hot water pretreatment of olive tree pruning residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 379-394, 2007.

CARDONA, C.A.; SANCHEZ, O.J.; GUTIERREZ, L.F. **Process synthesis for fuel ethanol production**, Boca Raton: CRC, 2010, p. 43–75

CARNEIRO, L.M. **Avaliação de estratégias de adaptação da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando à produção de etanol**. 2011. 175f. Tese (Doutorado) Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2011.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; MORALES, M.L.V.; SOLENZAL, A.I. Detoxification of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate with ion-exchange resins for xylitol production by calcium alginate-entrapped cells. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 863-868, 2004.

CARVALHO, R.J.; MARTON, J.M.; SILVA, F.; FELIPE, M.G. Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. **Revista Analytica**, n. 18, p.48-55, 2005.

CARVALHO, G.B.M.; MUSSATTO, S.I.; CÂNDIDO, E.J.; SILVA, J.B.A. Comparison of different procedures for the detoxification of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate for use in fermentative processes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p.152-157, 2006.

CEPA (2011) – Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola. Arroz (Safrá 2010/2011): **Produção e Mercado Mundial**. Disponível em: <http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2011/Arroz%20sintese%202011.pdf> Acesso em 08 de outubro de 2011.

CHANDEL, A.K.; KAPOOR, R.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1947-1950, 2007.

CHANDEL, A. K.; SINGH, O. V.; RAO, L. V.; CHANDRASEKHAR, G.; NARASU, M. L. Bioconversion of novel substrate *Saccharum spontaneum*, a weedy material, into ethanol by *Pichia stipitis* NCIM3498. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1709-1714, 2011.

CHENG, K.K.; GE, J.P.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; ZHOU, Y.J.; YANG, M.D.; XU, J.M. Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicelluloses hydrolysate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1051–1055, 2007.

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.

CHEN, W-H.; PEN, B-L.; YU, C-T.; HWANG, W-S. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2916-2924, 2011.

CHERRINGTON, C.A.; HINTON, M.; CHOPRA I. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 69-71, 1990.

COGHE, S.; BENOOT, K.; DELVAUX, F.; VANDERHAEGEN, B.; DELVAUX, F.R. Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 602-608, 2004.

CONAB (2013) - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira. Grãos.** Safra 2012/2013. Julho/2013. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_07_09_09_04_53_boletim_graos_junho_2013.pdf>. Acesso em 08 de janeiro de 2014.

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA. Junta de Andalucía. Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera. **Boletines de cultivos. El olivar andaluz.** Disponível em: <http://dgpa.besana.es/boletines/olivar.do>. Acesso em: 4 de outubro de 2011.

CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J.M.; PEREGO, P.; SILVA, S.S.; ZILLI, M. Wood Hydrolysis and Hydrolysate Detoxification for Subsequent Xylitol Production. **Chemical Engineering and Technology**, v. 23, n 11, p. 1013-1020, 2000.

CORREIA, E. **Mercado de gasolina:** impacto da introdução dos veículos *flex-fuel*. Resumo Estratégico Petrobrás, Rio de Janeiro, Julho, 2005.

CRUZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. **Food Biotechnology**, v.14, p.79-97, 2000.

DAGLEY, S.A. Biochemical approach to some problems of environmental pollution. **Essays Biochemistry**, v.11, p.81-138, 1975.

DELER, M.L.R. ; NAPOLES, A.I.S. ; VILLARREAL, M.L.M. ; MARTINEZ, E.A. ; MANGANELLY, E.S. ; GONZALEZ, M.B. Obtención de xilitol a partir de hidrolizados de bagazo de caña. **CubaAzúcar**, v. 29, n. 1, p. 21-24, 2000.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Acid hydrolysis of wheat straw and process considerations for ethanol fermentation by *Pichia stipitis* Y7124. **Process Biochemistry**, v. 25, p. 132-5, 1990.

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, p. 220-225, 1996.

DE WULF, O.; THONART, P.H.; GAIGNAGE, P.H.; MARLIER, M.; PARIS, A; PAQUOT, M. Bioconversion of vanillin to vanillyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 17, p. 605-615, 1986.

DIAZ, M.J.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; MOYA, 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.

DIEN B.S.; COTTA, M.A.; JEFFRIES, T.W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 3, p. 258–266, 2003.

DING, M-Z.; WANG, X.; YANG, Y.; YUAN, Y-J. Metabolism study of interactive effects of phenol, furfural, and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Integrative Biology**, v. 15, n. 10, p. 647-653, 2011

DODD, D.; CANN, I.O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, p. 2-17, 2009.

DONAGHY, J.A.; KELLY, P.F.; McKAY, A. Conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol by yeasts isolated from unpasteurised apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 456, p. 453-456, 1999.

DOTEN, R.C.; NGAI, K.; MITCHELL, D.J.; ORNSTON, L.N. Cloning and genetic organization of the *pca* gene cluster from *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.3168–3174, 1987.

DUMITRIUS, S. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**. New York: D Dekker, 2005, cap. 43.

DU PREEZ, 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, p. 360-364, 1986.

DU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 944-952, 1994.

EBRINGEROVA, A.; HROMADKOVA, Z.; HEINZE, T. Hemicellulose. **Advances in Polymer Science**, v. 186, p. 1-67, 2005.

EBRINGEROVA, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses in: MACROMOLECULAR symposia - hemicelluloses, Fischer K., Heinze, T., (Eds), Wiesbaden, Germany: Wiley-VCH, 2006, p. 1-12.

EKEN-SARAÇOĞLU, N.; ARSLAN, Y. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 855-858, 2000.

ELSEED, A.M.A.F. Effect of supplemental protein feeding frequency on ruminal characteristics and microbial N production in sheep fed treated rice straw. **Small Ruminant Research**, v. 57, p. 11-17, 2005.

EPAMIG (2012) - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte, p.385-432, 2012.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 2004, p. 1-423.

FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 231-240, 2002.

FENGEL, D.; WENEGER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989, 610 p.

FITZGERALD, D.J.; STRATFORD, M.; NARBAD, A. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 2708, p. 1-10, 2003.

FONSECA, B.G.; MOUTTA, R.O.; FERRAZ, F.O.; VIEIRA, E.R.; NOGUEIRA, A.S.; BARATELLA, B.F.; RODRIGUES, L.C.; HOU-RUI, Z.; SILVA, S.S. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol. 38, p. 199–207, 2011.

FULLER G.; McKEON T.A.; BILLS D.D. Agricultural materials as renewable resources: non-food and industrial applications, ACS Symposium Series 647, Washington, DC: American Chemical Society, 270 p, 1996.

GARCIA, D. **Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte**. 2012. 153f. Tese (Doutorado) Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2012.

GE, J-P.; CAI, B-Y.; LIU, G-M.; LING, H-Z.; FANG, B-Z.; SONG, G.; YANG, X-F.; PING, W-X. Comparison of different detoxification methods for corn cob hemicellulose hydrolysate to improve ethanol production by *Candida shehatae* ACCC 20335. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 10, p. 1163-1168, 2011.

GRANT, G.G.; LANGEVIN, D. Structure-activity relationships of phenolic and nonphenolic aromatic acids as oviposition stimuli for the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). **IOBC wprs Bulletin**, v. 25, p. 1-10, 2002.

GUERRERO, G.A. **Nueva olivicultura**. Madrid: Mundi-Prensa, 2003, 304 p.

GIBSON, D.T. **Microbial degradation of organic compounds**. New York: Marcel Dekker. 1984. p. 181-294.

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

GROOTJEN, D.R.J.; VANDERLANS, R.; LUYBEN, K. Effects of the aeratoir 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.

HAHN-HAGERDAL, B.; KARKUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 937-953, 2007.

HANSEN, E.H.; MØLLER, B.L.; KOCK, G.R.; BÜNNER, C.M.; KRISTENSEN, C.; JENSEN, O.R.; OKKELS, F.T.; OLSEN, C.E.; MOTAWIA, M.S.; HANSEN, J. De Novo Biosynthesis of Vanillin in Fission Yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2765-2774, 2009.

HEER, D.; HEINE, D.; SAUER, U. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7631-7638, 2009.

HERRERA, A.; TÉLLEZ-LUIS, S.J.; RAMÍREZ, J.A.; VÁZQUEZ, M. Production of D-D-xilose from sorghum straw using hydrochloric acid. **Journal of Cereal Science**, v.37, p.267-274, 2003.

HON, D.N.-S.; SHIRAISHI, N. **Wood and cellulosic chemistry**. 2nd.ed., rev. e aum. New York : Marcel Dekker, 2001, 914 p.

HORVÁTH, 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.

HOUNSOME, N.; HOUNSOME, B.; TOMOS, D.; EDWARDS-ONES, G. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. R48-R65, 2008.

HOU-RUI, Z.; XIANG-XIANG, Q.; SILVIA, S. S.; SARROUH, B. F.; AI-HUA, C.; YU-HENG, Z.; KE, J.; QIU, X. Novel isolates for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.152, n.2, p.199-212, 2008.

HUANG, Z.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J.P. Microbial transformation of ferúlico acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 2244-2250, 1993.

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

IEA-Apta. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, v. 8, n. 2, Fevereiro, 2013. Disponível em: <<ftp://ftp.sp.gov.br/ftpica/AIA/AIA-01-2013tabelas.pdf>> Acesso em 26 de fevereiro de 2013.

IOC – INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/news/view/618-year-2011-news/137-market-newsletter-april-2011>>. Acesso em: 12 de abril de 2012.

JEFFRIES, T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. In: PENTOSEs and Lignin. Berlin: Springer, 1983. p. 1-32.

JEFFRIES, T. W.; LIGHTFOOT, E. N.; FADY, J. H; Effect of glucose supplements on the fermentation of xylose by *Pachsolon tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 171-176, 1985.

JEPPSSON, H.; ALEXANDER, N. J.; HAHN-HAGERDAL, B. Existence of Cyanide-Insensitive Respiration in the 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.

JÖNSSON, L.J.; PALMQVIST, E.; NILVEBRANT, N.O.; HAHN-HÄGERDAL, B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 691–697, 1998.

KARIMI, K.; KLERADMANDINIA, S.; TAHERZADEH, M.J. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, p. 247-253, 2006.

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.

KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B.; AHRING, B.K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 10–26, 2004.

KOOPMAN, F.; WIERCKX, N.; WINDE, J.H.; RUIJSSENAARS, H. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. **PNAS**, v. 107, n. 11, p. 4919–4924, 2010.

KUHAD, R.C.; SING, A. Lignocellulosic biotechnology: Current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.

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.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 104, p. 229-242, 1993.

LARROY, C.; FERNÁNDEZ, M.R.; GONZÁLEZ, E.; PARÉS, X.; BIOSCA, J.A. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. **Biochemistry Journal**, v. 361, p. 163-172, 2002.

LARSSON, S.; QUINTANA-SÁINZ, A.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N-O.; JÖNSSON, L.J. Influence of Lignocellulose-Derived Aromatic Compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 616-632, 2000.

LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, L. J. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 91-103, 1999.

LAVEE, S. **Biología y fisiología del olivo. Enciclopedia Mundial del Olivo**. Madrid, 1997, p. 61-110.

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.

LEE, J.M.; VENDITTI, R.A.; JAMEEL, H.; KENEALY, W.R. Detoxification of wood hydrolyzates with activated carbono for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 626-636, 2011.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, v. 3, p. 1-39, 2001.

LIM, J.S.; MANAN, Z.A.; ALWI, S.R. W.; HASHIM, A. A review on utilisation of biomass from rice industry as a source of renewable energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3084-3094, 2012.

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

LIU, Z.L.; MOON, J. A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion. **Gene**, v. 446, p. 1-10, 2009.

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-hydroxymethylfuran and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.345-352, 2004.

LIU, Z.L.; BLASCHEK, H.P. **Lignocellulosic biomass conversion to ethanol by *Saccharomyces***. In : VERTES, A., QURESHI, N., YUKAWA, H., BLASCHEK, H (ed). Biomass to biofuels : strategies for global industries. West Sussex, UK : John Wiley & Sons, Ltd, 2010, p. 17-36.

LODOLO, E.J.; KOCK, J.L.F.; AXCELL, B.C.; BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1018-1036, 2008.

LOGSDAIL, D.H.; SLATER, M.J. **Solvent extraction in the process industries**. London: Elsevier Science Publishers, 1993. v. 1.

LOHMEIER-VOGEL, E.M.; SOPHER, C.R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 75-81, 1998.

MA, M.; LIU, Z.L. Comparative transcriptome profiling analyses during the lag phase uncover *YAP1*, *PDR1*, *PDR3*, *RPN4*, and *HSF1* as key regulatory genes in genomic adaptation to the lignocellulose derived inhibitor HMF for *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 660, p. 1-19, 2010.

MADEIRA JUNIOR, J.V. ; TEIXEIRA, C.B. ; MACEDO, G.A. Biotransformation and bioconversion of phenolic compounds obtainment : an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1-7, 2013.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M.E.; YORK, S.W.; PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass. **Biotechnology Program**, v. 16, p. 637-641, 2000.

MATEO, S.; PUENTES, J.G.; ROBERTO, I.C.; MOYA, A.J.; SÁNCHEZ, S. A new aproximation on olive pruning by-product characterization. **International Congress of Chemical Engineering (ICCE)**, Sevilla, 2012.

MATEO, S.; PUENTES, J.G.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A.J. Oligosaccharides and monomeric carbohydrates production from olive tree pruning biomass. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, p. 416-423, 2013.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T.E.; SUDHEESH, S. Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 44, p. 48-52, 2007.

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, 2009.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551-565, 2002.

MEYRIAL, V.; DELGENES, J.P.; ROMIEU, C.; MOLETTA, R.; GOUNOT, A.M. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Pichia stipitis* grown on D-xylose or on D-glucose. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 17, p. 535-540, 1995.

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

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

MOHAGHEGHI, A.; EVANS, K.; CHOU, Y.C.; ZHANG, M. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98–100, p. 885–898, 2002.

MOLDAVSKY, N.; COHEN, S. Determinants of liposome partitioning in aqueous two-phase systems: Evaluation by means of a factorial design. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, p. 529-537, 1996.

MONASTERIO, R.P.; FERNÁNDEZ, M.A.; SILVA, M.F. Olive oil by capillary electrophoresis: Characterization and genuineness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4477-4496, 2013.

MOON, J.; LIU, Z.L. Engineered NADH-dependent GRE2 from *Saccharomyces cerevisiae* by directed enzyme evolution enhances HMF reduction using additional cofactor NADPH. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 50, p. 115–120, 2012.

MORENO, A.D.; TOMÁS-PEJÓ, E.; IBARRA, D.; BALLESTEROS, M.; OLSSON, L. *In situ* laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 337-343, 2013.

MOUSDALE, D.M. **Biofuels: biotechnology, chemistry and sustainable development**; New York: CRC Press, 2008.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1681–1684, 2001.

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, p. 1-10, 2004.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Evaluation of nutrient supplementation to charcoal treated and untreated rice straw hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 497-502, 2005.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 268-274, 2006.

MUSSATO, S.I.; SANTOS, J.C.; ROBERTO, I.C. Effect of pH and activated charcoal adsorption on hemicellulosic hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 590-596, 2004.

MUKAI, N.; MASAKI, K.; FUJII, T.; KAWAMUKAI, M.; IEFUJI, H. *PAD1* and *FDC1* are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 564-569, 2010.

NARBAD, A.; GASSON, M.J. Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiology**, v. 144, p. 1397-1405, 1998.

NAVAEE-ARDEH, S.; MOHAMMADI-ROVSHANDEH, J.; POURJOOZI, M. Influence of straw cooking conditions in the soda-ethanol-water pulping on the mechanical properties of produced paper sheets. **Bioresource Technology** v. 92, p. 65-69, 2004.

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

NICHOLS, N.N.; DIEN, B.S.; COTTA, M.A. Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7545-7550, 2010.

NIGAM, J.N. Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 145-150, 2001.

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

OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V.; BRIJWANI, K.; BHARGAV, V.K.; PATIL, R.T.P. Enhanced ethanol production via fermentation of rice straw with hydrolysate-adapted *Candida tropicalis* ATCC 13803. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1299-1306, 2010.

OH, G.H.; PARK, C.R. Preparation and characteristics of rice-straw-based porous carbons with high adsorption capacity. **Fuel**, v. 81, p. 327-336, 2002.

OKUDA, N.; SONUERA, M.; NINOMIYA, K.; KATAKURA, Y.; SHIOYA, S. Biological detoxification of waste house Wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.106, n.2, p.128-133, 2008.

ORTEGA-GARCÍA, F.; BLANCO, S.; PEINADO, M. A.; PERAGÓN, J. Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropeína concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. **Tree Physiology**, v. 28, p. 45–54, 2008.

O'SULLIVAN, A.C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, p. 173-207, 1997.

OUTLAW, J.; COLLINS, K.; Duffield, J. Eds., **Agriculture as a producer and consumer of energy**. Wallingford, UK: CABI, 2005.

PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J.S.; HAHN-HÄGERDAL, B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 4, p. 447-454, 1999.

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

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibitors and detoxification. **Bioresource Technology**, v.74, p.17-24, 2000.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological Production of xylitol. Part I: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, n.3, p. 191-201, 1998.

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 and Biotechnology**, v. 38, p. 71–78, 2011.

PERRY, R.H.; GREEN, D.W. **Perry's Chemical Engineering Handbook**. 7th. ed., New York: Mcgraw-Hill, 1997.

PI, Z.K.; WU, Y.M.; LIU, J.X. Effect of pretreatment and pelletization on nutritive value of rice straw-based total mixed ration, and growth performance and meat quality of growing Bôer goats fed on TMR. **Small Ruminant Research**, v. 56, p. 81-88, 2005.

PUNTES, J.G.; MATEO, S.; FONSECA, B.G.; ROBERTO, I.C.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A.J. Monomeric carbohydrates production from olive tree pruning biomass: modeling of dilute acid hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 149-154, 2013.

PRELA-PANTANO; TERAMOTO, J.R.S; BERTONCINI, E.I. Análises preliminares das condições climáticas do estado de São Paulo para o cultivo de oliveiras. 2010. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_3/ClimaOliva/index.htm>. Acesso em: 12/8/2012.

ROBERTO, I.C.; LACIS, L.C.; BARBOSA, M.F.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis*, for the production of ethanol. **Process Biochemistry**, v. 26, p. 15-21, 1991.

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

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

ROE, A.J.; MCLAGGAN, D.; DAVIDSON, I.; O'BYRNE, C.; BOOTH, I.R. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 767-772, 1998.

ROE, A.J.; O'BYRNE, C.; MCLAGGAN, D.; BOOTH, I.R. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. **Microbiology**, v. 148, p. 2215-2222, 2002

ROMERO, I.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, M.; CASTRO, E.; RUIZ, E.; BRAVO, V. Fermentation of olive tree pruning acid-hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p. 108-115, 2007.

SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU, V.Y. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3693-3700, 2005.

SILVA, J.P.A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz**. 2007.144f. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2007.

SILVA, J.P.A. **Aplicação de processos oxidativos avançados como uma nova estratégia para a destoxificação de hidrolisado hemicelulósico visando à produção de etanol.** 201.265f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2011.

SILVA, J.P.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C. Treatment of rice straw hemicellulosic hydrolysates with advanced oxidative processes: a new and promising detoxification method to improve the bioconversion process. **Biotechnology Biofuels**, v. 6, n. 23, p. 1-13, 2013a.

SILVA, J.P.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C., Assessment of advanced oxidative processes based on heterogeneous catalysis as a detoxification method of rice straw hemicellulose hydrolysate and their effect on ethanol production by *Pichia stipitis*. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2013b.

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.

SILVA, J.P.; MUSSATTO, S.; ROBERTO, I.C. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 5, p. 1306–1315, 2010.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocateau reagent. **Methods Enzymol.**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J. Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 727 – 731, 1990.

SLININGER, P.J.; THOMPSON, S.R.; WEBER, S.; LIU, Z.L.; MOON, J. Repression of xylose-specific enzymes by ethanol in *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* and utility of repitching xylose-grown populations to eliminate diauxic lag. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 8, p. 1801-1815, 2011.

SMITH, M.R. The physiology of aromatic hydrocarbon degradation bacteria, In: biochemistry of microbial degradation, (ed.) Colin Ratledge. 1994. p. 347-378.

SOLOMONS, T.W.G. **Química Orgânica**, 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

SOUSA, B.A.A. **Funcionalidade dos extratos fenólicos obtidos pelo cultivo semi-sólido de resíduos de abacaxi (*Ananas comosus* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.)**. 118f. Dissertação (Mestrado) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

SUN, R.C.; SUN, X.F.; WANG, S.Q.; ZHU, W.; WANG, X.Y. Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. **Industrial Crops and Products**, v. 15, p. 179–188, 2002.

TAHERZADEH, M.J., GUSTAFSSON, L., NIKLASSON, C LIDÉN, G. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 2, p. 169-174, 1999.

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

TANIGUCHI, M.; SUZUKI, H.; WATANBE, D.; SAKAI, K.; KOSHINO, K.; TANAKA, T. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 637-643, 2005.

TELLI-OKUR, M.; EKEN-SARAÇOĞLU, N. Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2162-2169, 2008.

TERADA, H. Uncouplers of Oxidative Phosphorylation. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 213-218, 1990.

THOMAZ, D. **Melhoramento das condições de hidratação da levedura seca instantânea de panificação por tratamentos com soluções de aditivos**. 80f. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

TOMME, P.; WARREN, R.A.J.; GILKES, N.R. **Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi**, In: Advances in microbial physiology, Poole, R.K. (Ed), pp. 1-81, London: Academic Press, 1995, p. 1-81, ISBN 0-12-027737-9.

TRUDGILL, P.W. Metabolism of 2-furoic acid by *Pseudomonas* F2. **Biochemistry Journal**, v. 113, p. 577-587, 1969.

TSUJIYAMA, S.; UENO, M. Formation of 4-vinyl guaiacol as an intermediate in bioconversion of ferulic acid by *Schizophyllum commune*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 212-215, 2008.

UNDERWOOD, S.A.; BUSZKO, M.L.; SHANMUGAM, K.T.; INGRAM, L.O. Lack of protective osmolytes limits final cell density and volumetric productivity of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 2734-2740, 2004.

UNEP (2009) - United Nations Environmental Programme. **Converting Waste Agricultural Biomass into a Resource**. Disponível em: <http://www.unep.org/ietc/Portals/136/Publications/Waste%20Management/WasteAgriculturalBiomassEST_Compendium.pdf>. Acesso em 27 de julho de 2013.

ÚNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Produção de etanol será 0,52% maior na nova safra**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2011/03/producao-de-etanol-sera-052-maior-na-nova-safra-diz-unica.html>>. Acesso em 27 de setembro de 2011.

VANBENEDEN, N.; GILS, F.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F.R. Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: occurrence of volatile phenolic flavor compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. **Food Chemistry**, v. 107, p. 221-230, 2008.

VAN VLEET, J.H.; JEFFRIES, T.W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 300-306, 2009.

VILLA, P. **El cultivo del olivo**. Barcelona: Editorial De Vecchi, 2007. 143 p.

VILLARREAL, M.L.M.; PRATA, A.M.R.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 17-24, 2006.

WIERCKX, N.; KOOPMAN, F.; BANDOUNAS, L.; WINDE, J.H.; RUIJSSENAARS, J. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysates. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 336-343, 2010.

WIERCKX, N.; KOOPMAN, F.; RUIJSSENAARS, H.J.; WINDE, J.H. Microbial degradation of furanic compounds: biochemistry, genetics, and impact. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 92, p. 1095-1105, 2011.

WULF, O.; GAIGNAGE, T.; MARLIER, M.; PARIS, A.; PAQUOT, M. Bioconversion of vanillin to vanillyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, n. 17, p. 605-616, 1986.

YANG, H.S.; KIM, D.J.; LEE, Y.K.; KIM, H.J.; JEON, J.Y.; KANG, C.W. Possibility of using waste tire composites reinforced with rice straw as construction materials. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 61-65, 2004.

ZALVIDAR, 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.

ZALVIDAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L.O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 5, p. 524-530, 2000.

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***. 2013.218f. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2013.

ZHANG, D.; ONG, Y.L.; LI, Z.; WU, J.C. Biological detoxification of furfural and 5-hydroxyl methyl furfural in hydrolysate of oil palm empty fruit bunch by *Enterobacter* sp. FDS8. **Biochemical Engineering Journal**, v. 72, p. 77-82, 2013.

ZHU, J.; YONG, Q.; XU, Y.; YU, S. Detoxification of corn stover prehydrolyzate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1663-1668, 2010.

Apêndice A - RESULTADOS DOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ REFERENTES ÀS REDUÇÕES NOS TEORES DE FURANOS E COMPOSTOS FENÓLICOS

Tabela A.1 - Teor e porcentagens de variação das concentrações de furanos no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz após tratamento empregando *Saccharomyces cerevisiae* nas diferentes condições avaliadas no planejamento experimental

Ensaio	5-HMF		Furfural		Ácido Furóico	
	mg/L	R (%)	mg/L	R (%)	mg/L	R (%)
E01	504,9	3,9	215,9	18,3	971,8	7,3
E02	448	14,7	170,9	35,3	969,9	7,5
E03	88,3	74,9	21,4	89,5	903,6	21,0
E04	23,2	93,4	17,0	91,6	730,3	36,2
E05	462,4	12,0	215,0	18,6	997,6	4,8
E06	456,1	13,2	175,5	33,6	1004,9	4,1
E07	100,8	71,3	16,5	91,9	914,1	20,1
E08	24,3	93,1	11,6	94,3	764,7	33,2
E09	289,9	34,2	51,3	78,4	965,3	8,5
E10	103,2	76,6	39,2	83,5	896,1	15,1
E11	435,8	17,1	218,5	17,3	1018,4	2,8
E12	87,2	75,2	36,1	82,2	903,2	21,1
E13	203,1	53,9	24,7	89,6	966,3	8,4
E14	210	52,4	25,4	89,3	988,3	6,3
E15*	134,7	69,4	35,7	85,0	958,5	9,2
E16*	129,2	70,7	33,6	85,9	927,9	12,1
E17*	127,1	71,2	34,3	85,6	953,3	9,7
E18*	130,5	70,4	34,9	85,3	972,3	7,9

*Ponto central. R (% redução).

Tabela A.2 - Teor e porcentagens de variação das concentrações de compostos fenólicos de baixa massa molar no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae* nas condições avaliadas do planejamento experimental

Ensaio	Vanilina		Álcool Vanilil		Ácido Vanílico		Ácido Siríngico		Ácido <i>p</i> -cumárico		Ácido Ferúlico	
	mg/L	R (%)	mg/L	R (%)	mg/L	R (%)	mg/L	R (%)	mg/L	R (%)	mg/L	R (%)
E01	54,7	1,8	85,3	8,2	64,5	32,3	32,5	0	123,5	13,8	313,3	7,1
E02	52,1	6,5	87,1	6,2	64,4	32,4	33,5	0	113,7	20,7	282,1	16,4
E03	19,4	66,0	120,8	-4,6 [#]	77	14,4	41,9	32,6	132,8	0	342,0	0
E04	19,1	66,4	112,5	2,6	78,5	12,8	42,4	34,2	128,5	0	335,2	0
E05	54,6	2,0	83,4	10,2	70,6	25,9	35,1	0	126	12,1	316,5	6,2
E06	54,3	2,5	83,6	10,0	69,4	27,2	35,4	0	114,7	20,0	284,9	15,5
E07	20,8	63,4	116,8	-1,1 [#]	80,1	11,0	44	39,2	130,2	0	344	0
E08	20,5	64,0	108,8	5,8	80,3	10,8	43,6	38,0	130,5	0	334,1	0
E09	21,6	61,8	105,6	-38,2 [#]	74,1	24,1	39,2	17,0	127,8	14,1	312,7	6,9
E10	17,2	69,6	110,3	-44,4 [#]	76,2	21,9	40,9	22,1	119,2	19,8	295,7	11,9
E11	51,6	7,4	61,3	34,0	67,6	29,1	30,9	0	116,1	19,0	292,8	13,2
E12	18,8	67,0	208,6	-80,6 [#]	85,9	4,6	44,5	40,8	130,1	0	314,9	6,3
E13	16,4	71,0	185,5	-142,8 [#]	74,6	23,6	38,8	15,8	126,8	14,7	316,2	5,8
E14	17	70,0	188,7	-147,0 [#]	76,9	21,2	40,3	20,3	127,2	14,5	315,9	5,9
E15*	22,7	59,9	169,5	-121,8 [#]	74,5	23,7	39,2	17,0	124,6	16,2	313	6,8
E16*	22,4	60,4	161,6	-111,5 [#]	72,9	25,3	39,7	18,5	123,1	17,2	316,2	5,8
E17*	23,6	58,3	164,5	-115,3 [#]	74,8	23,4	41,2	23,0	123,9	16,7	316,6	5,7
E18*	23,2	59,0	166,4	-117,8 [#]	73,9	24,3	40,3	20,3	124,1	16,5	317,6	5,4

*Ponto central. R (%) redução). [#] Aumento da concentração (em porcentagem) observado após o biotratamento.

Apêndice B - RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTES ÀS REDUÇÕES NOS TEORES DE FURANOS E COMPOSTOS FENÓLICOS

Tabela B.1 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados sobre a redução no teor de 5-HMF durante biotratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
X ₁	896,81	1	896,81	8,26	0,0207
X ₂	12040,9	1	12040,9	110,92	< 0,0001
X ₃	0,14	1	0,14	1,3 x 10 ⁻³	0,9718
X ₁ ²	15,25	1	15,25	0,14	0,7175
X ₂ ²	366,04	1	366,04	3,37	0,1036
X ₃ ²	57,90	1	57,90	0,53	0,4860
X ₁ X ₂	100,11	1	100,11	0,92	0,3650
X ₁ X ₃	4,96	1	4,96	0,046	0,8361
X ₂ X ₃	13,78	1	13,78	0,13	0,7308
Erro	1,73	3	0,58	-	-
Total	15096,6	17	-	-	-
R² = 0,94					

X₁ (concentração de *Saccharomyces cerevisiae*); X₂ (pH inicial) e X₃ (fator de aeração). SQ (soma quadrática); GL (graus de liberdade); MQ (média quadrática).

Tabela B.2 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados sobre a redução no teor de furfural durante biotratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
X ₁	173,06	1	173,06	30,41	0,0006
X ₂	10653,70	1	10653,70	1872,15	< 0,0001
X ₃	1,16	1	1,16	0,20	0,6642
X ₁ ²	1,46	1	1,46	0,26	0,6265
X ₂ ²	2763,16	1	2763,16	485,56	< 0,0001
X ₃ ²	163,45	1	163,45	28,72	0,0007
X ₁ X ₂	94,53	1	94,53	16,61	0,0036
X ₁ X ₃	0,36	1	0,36	0,063	0,8074
X ₂ X ₃	5,28	1	5,28	0,93	0,3636
Erro	1,73	3	0,58	-	-
Total	15096,6	17	-	-	-
R² = 0,99					

X₁ (concentração de *Saccharomyces cerevisiae*); X₂ (pH inicial) e X₃ (fator de aeração). SQ (soma quadrática); GL (graus de liberdade); MQ (média quadrática).

Tabela B.3 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados sobre a redução no teor de vanilina durante biotratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
X ₁	19,60	1	19,60	0,85	0,3824
X ₂	9400,36	1	9400,36	409,66	< 0,0001
X ₃	9,60	1	9,60	0,42	0,5358
X ₁ ²	6,25	1	6,25	0,27	0,6158
X ₂ ²	2441,81	1	2441,81	106,41	< 0,0001
X ₃ ²	29,17	1	29,17	1,27	0,2922
X ₁ X ₂	2,20	1	2,20	0,096	0,7645
X ₁ X ₃	2,00	1	2,00	0,087	0,7753
X ₂ X ₃	0,18	1	0,18	7,8 x 10 ⁻³	0,9316
Erro	2,62	3	0,87	-	-
Total	13397,76	17	-	-	-
R² = 0,99	-	-	-	-	-

X₁ (concentração de *Saccharomyces cerevisiae*); X₂ (pH inicial) e X₃ (fator de aeração). SQ (soma quadrática); GL (graus de liberdade); MQ (média quadrática).

Tabela B.4 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados sobre a redução no teor de ácido *p*-cumárico durante biotratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
X ₁	42,03	1	42,03	72,24	< 0,0001
X ₂	732,74	1	732,74	1259,55	< 0,0001
X ₃	0,68	1	0,68	1,16	0,3125
X ₁ ²	0,73	1	0,73	1,25	0,2951
X ₂ ²	130,17	1	130,17	223,75	< 0,0001
X ₃ ²	9,08	1	9,08	15,61	0,0042
X ₁ X ₂	27,38	1	27,38	47,07	0,0001
X ₁ X ₃	0,13	1	0,13	0,21	0,6553
X ₂ X ₃	0,72	1	0,72	1,24	0,2982
Erro	0,53	3	0,18	-	-
Total	1077,72	17	-	-	-
R² = 0,99	-	-	-	-	-

X₁ (concentração de *Saccharomyces cerevisiae*); X₂ (pH inicial) e X₃ (fator de aeração). SQ (soma quadrática); GL (graus de liberdade); MQ (média quadrática).

Tabela B.5 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados sobre a redução no teor de ácido ferúlico durante biotratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
X ₁	55,70	1	55,70	14,63	0,0051
X ₂	271,44	1	271,44	71,31	< 0,0001
X ₃	0,29	1	0,29	0,076	0,7899
X ₁ ²	1,03	1	1,03	0,27	0,6163
X ₂ ²	2,54	1	2,54	0,67	0,4378
X ₃ ²	23,30	1	23,30	6,12	0,0385
X ₁ X ₂	43,25	1	43,25	11,36	0,0098
X ₁ X ₃	0,000	1	0,000	0,000	1,0000
X ₂ X ₃	0,41	1	0,41	0,11	0,7526
Erro	1,11	3	0,37	-	-
Total	425,79	17	-	-	-
R² = 0,93	-	-	-	-	-

X₁ (concentração de *Saccharomyces cerevisiae*); X₂ (pH inicial) e X₃ (fator de aeração). SQ (soma quadrática); GL (graus de liberdade); MQ (média quadrática).

Tabela B.6 - Análise de variância de regressão para o modelo representativo da redução no teor de 5-HMF durante biotratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte	SQ	GL	MQ	F	p
Modelo	14228,2	9	1580,91	14,56	0,0005
Resíduo	868,43	8	108,55	-	-
Falta de Ajuste	866,70	5	173,34	301,02	0,0003
Erro Puro	1,73	3	0,58	-	-
Total	15096,6	17	-	-	-
R² = 0,94	-	-	-	-	-

Tabela B.7 - Análise de variância de regressão para o modelo representativo da redução no teor de furfural durante biotratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte	SQ	GL	MQ	F	p
Modelo	14604,86	9	1622,76	285,16	< 0,0001
Resíduo	45,52	8	5,69	-	-
Falta de Ajuste	45,07	5	9,01	60,10	0,0033
Erro Puro	0,45	3	-	-	-
Total	14650,38	17	0,15	-	-
R² = 0,99	-	-	-	-	-

Tabela B.8 - Análise de variância de regressão para o modelo representativo da redução no teor de vanilina durante biotratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte	SQ	GL	MQ	F	p
Modelo	13214,18	9	1468,24	63,98	< 0,0001
Resíduo	183,58	8	22,95	-	-
Falta de Ajuste	180,96	5	36,19	41,44	0,0057
Erro Puro	2,62	3	-	-	-
Total	13397,76	17	0,87	-	-
R² = 0,99	-	-	-	-	-

Tabela B.9 - Análise de variância de regressão para o modelo representativo da redução no teor de ácido *p*-cumárico durante biotratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte	SQ	GL	MQ	F	p
Modelo	1073,07	9	119,23	204,95	< 0,0001
Resíduo	4,65	8	0,58	-	-
Falta de Ajuste	4,12	5	0,82	4,67	0,1174
Erro Puro	0,53	3	0,18	-	-
Total	1077,72	17	-	-	-
R² = 0,99	-	-	-	-	-

Tabela B.10 - Análise de variância de regressão para o modelo representativo da redução no teor de ácido ferúlico durante biotratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte	SQ	GL	MQ	F	p
Modelo	395,34	9	43,93	11,54	0,0011
Resíduo	30,45	8	3,81	-	-
Falta de Ajuste	29,34	5	5,87	15,90	0,0228
Erro Puro	1,11	3	0,37	-	-
Total	425,79	17	-	-	-
R² = 0,93	-	-	-	-	-

Apêndice C – Trabalhos publicados a partir de resultados obtidos nesta tese.Trabalho publicado em periódico internacional:

FONSECA, B.G.; PUENTES, J.G.; MATEO, S.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A.J.; ROBERTO, I.C. Detoxification of rice straw and olive tree pruning hemicellulosic hydrolysates employing *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on the ethanol production by *Pichia stipitis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 9658-9665, 2013.

Apresentação oral em congresso internacional:

FONSECA, B.G.; PUENTES, J.G.; MATEO, S.; SANCHEZ, S.; MOYA, A.J.; ROBERTO, I.C. Evaluation of hemicellulose hydrolysates biotransformation on ethanol production by *Pichia stipitis*. In: **II Congreso Iberoamericano sobre Biorrefinerías**, 2013, Jaén. 2 st CIAB, 2013, v. 1, p. 191-198, 2013.

Apêndice D – Trabalhos extras publicados obtidos durante o doutorado.

Trabalho publicado em periódico internacional:

PUENTES, J.G.; MATEO, S.; FONSECA, B.G.; ROBERTO, I.C.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A.J. Monomeric carbohydrates production from olive tree pruning biomass: Modeling of dilute acid hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 149-154, 2013.

Trabalho completo publicado em anais de congresso:

FONSECA, B.G ; CABRAL, J.C.A.; ALVES, J.P. ; ROBERTO, I. C. Estudo da produção de etanol a partir de uma mistura de açúcares por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. In: **XVIII Simpósio Nacional de Biotecnologia**, 2011, Caxias do Sul. SINAFERM 2011, XVIII Simpósio Nacional de Biotecnologia, 2011.

Resumos publicados em anais de congressos

PUENTES, J.G.; MATEO, S.; FONSECA, B.G; MOYA, A.J.; ROBERTO, I.C.; SANCHEZ, S. Fermentation of hemicellulosic acid hydrolysates from olive tree pruning with *Candida guilliermondii* FTI.20037 at different scales. In: **II Congreso Iberoamericano sobre Biorrefinerías**, 2013, Jaén. 2 st CIAB, 2013, v. 1, p. 399-400.

CASTRO, R.C.A.; FONSECA, B.G; PEREIRA, T.H.A.; ZEFERINO, I.A.M.; ROBERTO, I.C. Alkali pretreatment of rice straw to decrease the hemicellulosic hydrolysate inhibitors. In: **1st Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference**, 2011, Campos do Jordão. 1st Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference, 2011.

Detoxification of Rice Straw and Olive Tree Pruning Hemicellulosic Hydrolysates Employing *Saccharomyces cerevisiae* and Its Effect on the Ethanol Production by *Pichia stipitis*

Bruno Guedes Fonseca,[†] Juan Gabriel Puentes,[‡] Soledad Mateo,[‡] Sebastian Sánchez,[‡] Alberto J. Moya,[‡] and Inês Conceição Roberto^{*,†}

[†]Department of Biotechnology, Engineering College of Lorena, University of São Paulo, 12.602-810 Lorena, São Paulo, Brazil

[‡]Department of Chemical, Environmental and Materials Engineering, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain

ABSTRACT: The aim of this work was to study the ability of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) to metabolize a variety of aromatic compounds found in rice straw (RSHH) and olive tree pruning (OTHH) hemicellulosic hydrolysates, obtained by acid hydrolysis at different sugar and toxic compound concentrations. Initially, the hydrolysates were inoculated with *S. cerevisiae* (10 g L⁻¹) and incubated at 30 °C under agitation at 200 rpm for 6 h. The results showed that this yeast was able to utilize phenolic and furan compounds in both hemicellulose hydrolysates. Next, the treated hydrolysates were inoculated with *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 to evaluate the effect of biotransformation of aromatic compounds on ethanol production, and better fermentation results were obtained in this case compared to untreated ones. The untreated hemicellulose hydrolysates were not able to be fermented when they were incubated with *Pichia stipitis*. However, in RSHH treated hydrolysates, ethanol ($Y_{P/S}$) and biomass ($Y_{X/S}$) yields and volumetric ethanol productivity (Q_P) were 0.17 g g⁻¹, 0.15 g g⁻¹ and 0.09 g L⁻¹ h⁻¹, respectively. The OTHH-treated hydrolysates showed less favorable results compared to RSHH, but the fermentation process was favored with regard to untreated hydrolysate. These results showed that the fermentation by *P. stipitis* in untreated hydrolysates was strongly inhibited by toxic compounds present in the media and that treatment with *S. cerevisiae* promoted a significant reduction in their toxicities.

KEYWORDS: biological detoxification, biotransformation of the aromatic compounds, rice straw, olive tree pruning, hemicellulosic hydrolysates, *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUCTION

Lignocellulosic biomasses such as rice straw and olive tree pruning are inexpensive sources of polysaccharides that can be degraded in monomeric sugars.^{1,2} One of the most abundant lignocellulosic feedstocks in developing countries, including Brazil, is the straw of various cereals, and the rice straw is being reported as one of the greatest byproducts of agricultural activities.³ The world production of rice crop for 2012 has reached a record of 488 million tons of grain, generating 680 million tons of straw distributed around the world, with a potential production of energy of 205 billion liters per year.⁴ Debris from olive tree pruning represents a great volume of biomass in Spain, especially in Andalucía, where annual production reaches 3.9 million tons, varying between 1700 and 3000 kg/(ha year), depending on culture conditions.^{2,5} Due to the large volumes of this residue and the environmental damage associated with this biomass, the possibility of valuing these byproducts from the agricultural industry has been suggested.^{1,2}

The major organic constituents of lignocellulosic materials are cellulose (30–50%), hemicellulose (20–40%) and lignin (15–30%).⁶ The hemicellulosic fraction of the residues can be recovered by dilute acid hydrolysis, generating mainly D-xylose monomers in the rice straw hemicellulosic hydrolysate¹ and a combination of D-xylose and D-glucose monomers in olive tree pruning hydrolysate as well.² Besides these monosaccharides, several inhibitory compounds are also formed during hydrolysis processes, including some products of sugar degradation

(furfural and 5-hydroxymethylfurfural-5-HMF), phenolic compounds derived from lignin degradation, and acetic acid, derived from hemicellulosic structure.^{1,2,7} The main phenolic compounds present in rice straw and olive tree pruning hemicellulosic hydrolysates are vanillin, vanillyl alcohol, vanillic acid, ferulic acid and coumaric acid.^{2,8,9} In addition, the olive tree hemicellulosic hydrolysate may also contain others phenolic compounds such as oleuropein, tyrosol, hydroxytyrosol and elenolic acid, known to present antioxidant properties, and antimicrobial properties by denaturing proteins and inactivating enzymes.^{9–12} The amount and type of toxic compounds generated depends on both severity pretreatment and biomass source, and their effects on *Pichia stipitis* fermentation have been studied.^{8,13,14} For example, Díaz et al.¹³ reported a decrease of 35% in ethanol volumetric production when *P. stipitis* CECT 1922 was cultivated in synthetic medium containing D-glucose (20.0 g L⁻¹) and D-xylose (15.0 g L⁻¹), and 2.0 g L⁻¹ of furfural. Evaluating the ethanol production by *P. stipitis* CBS 5773 in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate, Roberto et al.¹⁴ observed that furfural concentrations above 2.0 g L⁻¹ inhibited cell growth. However, at concentrations below 0.5 g L⁻¹, the

Received: June 10, 2013

Revised: August 29, 2013

Accepted: August 30, 2013

Published: August 30, 2013

aldehyde acted as carbon source, with a positive effect on the cell growth.

It is important to identify the potential inhibitors present in the hemicellulose hydrolysates before proposing a method or a sequence of methods for detoxification. This knowledge not only helps to choose an efficient and low-cost treatment but also let to establish conditions for hydrolysis that minimize its formation.^{7,8,15–17} Such strategies include physical, chemical and/or biological methods. Regarding to physical methods, the adsorption of inhibitors using activated carbon is effective in removing acetic acid and phenolic compounds, allowing better fermentation efficiency. However, these methods can remove substantial quantities of sugars in the medium by degradation.^{7,15} Chemical detoxification methods, which are based on pH change, have also been extensively studied. In these methods, the reduction of the toxicity of the hydrolysates is related to precipitation of metal ions and/or decomposition of furans, which are instable under certain pH conditions. These methods alone do not provide satisfactory results and are often employed in combination with physical methods.^{7,15,16}

The use of microorganisms and/or enzymes for detoxification of hydrolysates has been explored as a method able to overcome the toxicity of the hemicellulosic hydrolysates. In fact, studies using laccase to detoxify different hydrolysates, by oxidative polymerization of phenolic compounds, showed an increase in fermentation parameters compared with the untreated media.^{15,17} Jonsson et al.,¹⁷ evaluating fermentation of wood cellulosic hydrolysate by *S. cerevisiae*, and Chandel et al.,¹⁵ fermenting hemicellulosic hydrolysate from sugar cane bagasse with *Candida shehatae* NCIM 3501, observed an increase on ethanol volumetric productivity ($0.8\text{--}2.7\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$) and xylitol ($0.14\text{--}0.27\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$), respectively. Using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 as detoxifying-agent and *Candida tropicalis* CCTCC M 205067 as fermentation-agent of hydrolysate from sugar cane bagasse hemicellulosic, Hou-Rui et al.¹⁸ verified an increase of 50% xylitol volumetric productivity (1.03 for $2.01\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$). However, *I. occidentalis* specie consumed D-xyllose, the main sugar present in the hemicellulosic hydrolysate.^{18,19}

In the present study, we propose the use of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* to detoxify hemicellulosic hydrolysates from rice straw and olive tree pruning, since this microorganism is capable of converting furans and phenolic aldehydes into their corresponding alcohols, which are considered less toxic to the metabolism of various fermentative microorganisms, include *P. stipitis*.^{20,21} In addition, *S. cerevisiae* does not consume D-xyllose, the main sugar present in most plant biomass hemicellulose hydrolysates, which makes the advantageous process. The aim of this study is to contribute to the development of a biological detoxification procedure decreasing the toxicity of the hemicellulosic hydrolysates and to establish suitable conditions for the bioconversion of this hydrolysate fraction in ethanol.

MATERIALS AND METHODS

Raw Material. Rice straw was collected in Lorena, São Paulo state, Brazil. The material was sun-dried to approximately 10% moisture and milled to attain particles of about 1.0 cm in length and 1.0 mm in thickness. The olive tree pruning biomass consisted of leaves and branches (1:2 ratio) from trunks of olive trees and was collected in an olive grove situated in Jaén, Spain. The material was air-dried to 5% moisture, milled, screened to select the fraction of particles with diameter from 0.425 to 0.60 mm and homogenized in a single lot. The average chemical compositions of rice straw and olive tree pruning,

determined according to the methodology previously described by Browning,²² are shown in Table 1.

Table 1. Chemical Characterization of Rice Straw and Olive Tree Pruning Used in the Present Study

component	content (% on dry matter) ^a	
	rice straw	olive tree pruning
Cellulose	35.1 ± 0.6	24.9 ± 0.5
Hemicellulose	25.9 ± 0.5	15.3 ± 0.1
Acid-insoluble lignin	13.3 ± 1.9	17.6 ± 0.1
Acid-soluble lignin	5.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Acetyl Groups	1.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1
Ash	5.5 ± 0.1	3.4 ± 0.1

^aAverage of at least three determinations.

Hydrolysis Procedure. Rice straw hydrolysis experiments were carried out in a 350-L stainless steel reactor, at 120 °C, 50 rpm, during 30 min, and hydrolytic reaction of the olive tree pruning residue was carried out in autoclave, at 120 °C for 90 min. Both biomasses were impregnated with sulfuric acid solution at 1.0 and 2.0% w v⁻¹ at solid/acid solution ration of 1:10, according to Roberto et al.¹ and Mateo et al.,²³ respectively. The slurries obtained after hydrolysis were separated by centrifugation (2000× g, 20 min) and the liquid phases (hemicellulosic hydrolysates) were concentrated under vacuum at 70 °C in order to obtain approximate concentrations of furans and phenolics compounds (6- and 3-fold increase of the rice straw and olive tree pruning hemicellulosic hydrolysates, respectively). The volume of the hemicellulosic hydrolysates obtained after hydrolysis-reaction was divided into 3 equal parts and concentrated under vacuum separately.

Hemicellulosic Hydrolysates Biotoxification. The assays of biotoxification were realized in triplicate. The pH of hemicellulosic hydrolysates was adjusted to 5.5 with NaOH (pellets), followed by centrifugation at 1000× g for 15 min to remove the insoluble materials. First, the liquors were treated with 10 g L⁻¹ of lyophilized commercial *Saccharomyces cerevisiae* (Dr. Oetker). The yeast was previously hydrated in distilled water for 10 min at room temperature, with cellular viability greater than 85%. The biotoxification experiments were performed in shaker at 30 °C, 200 rpm for 6 h, using 250 mL Erlenmeyer flasks filled with 50 mL of hemicellulosic hydrolysates.

Pichia stipitis Inoculum Preparation. Cultures of the *Pichia stipitis* NRRLY-7124 were maintained on malt extract agar slants at 4 °C. The inoculum was prepared by transfer of yeast cells in the maintenance medium to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of the medium composed by (g L⁻¹): xylitol (30.0), MgSO₄·7H₂O (1.0), (NH₄)₂HPO₄ (3.0), KH₂PO₄ (19.0) and yeast extract (3.0). The inoculated flasks were incubated in rotary shaker at 30 °C under stirring at 200 rpm for 24 h. Next, the cells were recovered by centrifugation (1100× g for 20 min) and resuspended in sterile distilled water in order to obtain the cell concentrated suspension which was used as inoculum.

Medium and Fermentation Conditions. Fermentations assays were realized in triplicate carried out in untreated and treated hemicellulosic hydrolysates. First, the pH of hemicellulosic hydrolysates was adjusted to 5.5 with NaOH (pellets). Next, the hydrolysates were centrifuged to remove solid residue. The hemicellulosic hydrolysate from rice straw was supplemented with yeast extract (3.0 g L⁻¹),²⁴ and the olive tree hydrolysate with (g L⁻¹): MgSO₄·7H₂O (1.0), (NH₄)₂SO₄ (3.0), KH₂PO₄ (2.0), peptone (3.6), and yeast extract (4.0).²³ The experiments were carried out in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of hemicellulosic hydrolysates and inoculated with 1 g L⁻¹ of cells. The flasks were incubated in a rotator shaker at 30 °C, 200 rpm for 96 h.

Analytical Methods. Sugars, acetic acid, and ethanol concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) in Waters (Milford, MA) equipped with a refractive index detector and a Bio-Rad Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm)

Table 2. Concentration of Sugars and Toxic Compounds of the Rice Straw and Olive Tree Pruning Hemicellulosic Hydrolysates in Their Original and Concentrated Forms

concentration (g L ⁻¹) ^a	RSHH		OTHH	
	original	concentrated	original	concentrated
D-glucose	2.5 ± 0.1	14.4 ± 0.5	10.6 ± 0.2	33.8 ± 0.2
D-xylose	14.0 ± 0.6	87.2 ± 1.4	9.3 ± 0.2	28.8 ± 0.7
L-arabinose	2.4 ± 0.1	15.9 ± 0.8	3.8 ± 0.1	15.7 ± 0.2
Acetic acid	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.3	2.2 ± 0.1	4.0 ± 0.1
Furans ^b	0.21 ± 0.01	0.87 ± 0.03	0.74 ± 0.04	0.83 ± 0.03
Phenolics ^c	2.8 ± 0.1	10.5 ± 0.3	3.6 ± 0.2	9.3 ± 0.3

^aAverage of at least three determinations. ^bMartinez et al.²⁵ ^cSingleton et al.²⁶

(Hercules, CA). Operation conditions included: temperature of 45 °C, 0.005 M sulfuric acid as eluent in a flow of 0.6 mL min⁻¹ and sample volume of 20 µL. Dry-weight (g L⁻¹) calibration was determined by the absorbance of the cell suspension at a wavelength of 600 nm. Total furans were determined by spectrophotometric method described by Martinez et al.²⁵ The total content of phenolic compounds in hemicellulosic hydrolysates was estimated by the Folin-Ciocalteu modified method²⁶ using gallic or caffeic acids as standard. The ultraviolet-spectra (UV) of the hydrolysates were carried out in the range of 450–200 nm, with a pitch of 5 nm using quartz cuvettes. The spectrum determination was made with hydrolysate diluted with alkaline water (pH around 12) and distilled water used as blank (pH 12).

RESULTS AND DISCUSSION

Raw Materials Composition. The chemical composition and the percentage contents of rice straw and olive tree pruning employed in this study are presented in Table 1. It is found that among the structural components, cellulose corresponded to a greater portion of the material, and hemicellulose present in rice straw was 41% higher than that found for the olive tree pruning. It is also observed in Table 1 that the ash rice straw content is 40% higher than the olive tree pruning. This behavior was expected, since rice straw when compared with other lignocellulosic materials, straw ash has above. For example, the ash content present in malt bagasse and olive pruning, reported by Roberto et al.¹ and Mateo et al.,²⁷ were 11.4 and 3.8%, respectively. This peculiarity of rice straw can be explained by the fact that the material contains a high content of silicon dioxide (SiO₂), which confers high-level resistance against pathogenic microorganisms, however, complicates the process of degradation.^{3,5}

When comparing the results of rice straw characterization in the present study with other works reported in the literature, it appears that the cellulose, hemicellulose and lignin contents are within the range of variation 35–43%, 23–26% and 13–25%, respectively. As for the ash content, the material of the present study showed a value much lower than other values reported in the literature (approximately 12%).^{1,3,5,6,8} For the olive tree pruning, it is found that the levels of cellulose (25–31%), hemicellulose (13–23%) and lignin (18–24%) are also within the variation range reported in the literature.^{2,13,23,27} The differences in the composition observed for this type of residue may be associated with the ratio of wood:sheet generated after the pruning process.²³

Hemicellulosic Hydrolysates Composition. The composition of the rice straw (RSHH) and olive tree pruning (OTHH) hemicellulosic hydrolysates obtained by acid catalysis is showed in Table 2. As can be seen, the sugars and inhibitor compounds concentrations in hydrolysates varied with raw

materials employed as well as the conditions that have been employed in the hydrolysis process.

Total sugar concentration presented in RSHH and OTHH after dilute acid treatment were of 18.9 and 23.7 g L⁻¹, respectively. It is verified that D-xylose (14.0 g L⁻¹) as the highest concentration monomer in the RSHH. On the other hand, in OTHH both D-xylose (9.3 g L⁻¹) and D-glucose (10.6 g L⁻¹) were the major products obtained. In this hydrolysate, the D-glucose:D-xylose ratio may depend on the leaves and branches proportion present in the olive tree pruning. In fact, Mateo et al.²³ showed that the leaves and branches mixture of olive tree pruning contain a 1.3/1.0 hemicellulose/cellulose ration, while this fraction goes to 1.0/1.0 when olive tree pruning leaves free is used. The authors also found that in leaves of the olive tree pruning hemicellulosic fraction is twice than cellulose. In other work, Mateo et al.²⁷ show that higher D-glucose and D-xylose yields in olive tree pruning hemicellulosic acid hydrolysate, with leaves/branches proportion near to one, were 10.0 and 9.4% respectively, and obtained hydrolysis conditions were 190 °C, 0 min and 1% of H₂SO₄. These results are very similar to those obtained in present work.

Table 2 also shows that D-glucose concentration obtained in OTHH is 4.2 times greater than in RSHH. While D-xylose was the main monosaccharide in RSHH, and the pentoses proportion in this hydrolysate was 1.3 times higher than in OTHH. This can be justified because of the different nature of these biomasses. Besides sugar concentrations, Table 2 shows that the hydrolysates contain compounds potentially harmful to the fermentation process, such as acetic acid, furans and phenolic compounds. It is noticed that OTHH has higher concentrations of these toxic/inhibitory compounds. In both hemicellulosic hydrolysates, the total phenolic compound represents the main problem as its concentration is highest.

The concentration under vacuum process promoted proportional variations to the concentration factor only in the D-glucose and D-xylose levels, in both hemicellulosic hydrolysates (6.0 and 3.0 times for RSHH and OTHH, respectively), according to Table 2. The total fermentable sugars (D-glucose + D-xylose) concentrations were 101.6 and 62.6 g L⁻¹ for RSHH and OTHH, respectively, while L-arabinose concentration in both hydrolysates was approximately 15.8 g L⁻¹. Regarding inhibitor compounds, it was observed that the concentration of acetic acid increased too much in OTHH, corresponding 81%. The increase in total furans was 76 and 11%, with about 0.85 g L⁻¹ for both hydrolysates, and phenolic compounds levels, after the process of concentration, reached near 10.0 g L⁻¹ in both concentrated hydrolysates. The nonproportional increase of these inhibitor compounds after concentration process can be explained by their different boiling points under vacuum. So

during concentration step, acetic acid and furfural get more easily volatilized.²⁸

The presence of these toxic compounds in hemicellulosic hydrolysates pose problems for the bioconversion of sugars to ethanol by *Pichia stipitis*.^{2,7,8} For this reason, the RSSH and OTHH were submitted to biotransformation procedures employing *S. cerevisiae*, aiming towards a reduction of these compound concentrations, taking advantage of the very similar concentrations of total furans and phenolics in both concentrated hemicellulosic hydrolysates.

Biotransformation of the Hemicellulosic Hydrolysates.

The reduction percentages in sugars and inhibitors concentration present in hemicellulosic hydrolysates from rice straw and olive tree treated with *S. cerevisiae* are showed in Figure 1.

Figure 1. Sugars and inhibitor compounds concentrations in (a) RSSH and (b) OTHH, before (black) and after (gray) biotransformation treatment by *Saccharomyces cerevisiae*.

As can be seen, *S. cerevisiae* consumed 88 and 20% of the D-glucose, with ethanol production of 5.5 and 1.5 g L⁻¹ in RSSH and OTHH, respectively. As expected, the pentoses were nonassimilated, in both hemicellulosic hydrolysates, due to a lack of the enzyme responsible for D-xylose and L-arabinose assimilation.²⁹

It is verified also in Figure 1 that the acetic acid concentration increased slightly after detoxification process. This increase can be attributed to the reduction of the furans and phenols aldehydes to their respective alcohols by yeast *S. cerevisiae*. These reactions are catalyzed by nonspecific reductase enzymes, such as alcohol dehydrogenase, which leads to an

increase in intracellular acetaldehyde levels and subsequent oxidation of the aldehyde to acetic acid.^{13,20,21}

Baker's yeast was able to reduce the total furans in RSSH and OTHH by 50 and 35%, with residual concentrations of 0.44 and 0.54 g L⁻¹, respectively. These results were expected, since yeast has metabolic capacity to reduce furan aldehydes to their corresponding alcohols.^{30–35} However, it was observed no reduction in total phenolic compounds concentration in the RSSH (Figure 1a), and only 5% in OTHH (Figure 1b). This fact may be associated with the reaction of Folin-reagent and phenolic compounds. The reaction occurs between the hydroxyl groups present in these compounds and *S. cerevisiae* shows capability of reducing phenolic aldehydes and acids groups to their respective alcohols, which can compromise the analysis.³⁶ In order to confirm the reduction in the furans and phenolic compounds concentration, ultraviolet spectra were performed before and after the hydrolysates biotransformation. This technique can provide information regarding the presence of phenolic compounds derived from lignin and furans resulting from the degradation of carbohydrates and permits evaluation of the changes in concentration or even changes in the chemical structure of these molecules.^{8,25,37,38}

Figure 2 shows ultraviolet spectrum of the hemicellulosic hydrolysates before and after biological detoxification by *S. cerevisiae*, and it was verified a decrease of peaks in the 250–400 nm regions in both hydrolysates employed. In the present study, it was observed an absorptive reduction of 36 and 17% at 280 nm for RSSH and OTHH, respectively. According to Martinez et al.,²⁵ most of the reduction in 280 nm is attributable to furfural and/or 5-HMF, since this region is verified as the maximum absorption area of these inhibitors, and only a small part of the soluble lignin is quantified. It is also known that the reduction products of furans compounds have greater ultraviolet-absorptive in the 190–210 nm regions.³⁹ Some studies have reported a reduction of 5-HMF to alcohol-HMF,^{30–32} as well as the furfural reduction to furfuryl-alcohol under anaerobic and aerobic conditions when *S. cerevisiae* is used.^{30,33,34} Liu et al.³¹ suggest that the aldehyde functional group present on the furan ring is the cause of toxicity of these compounds; however, their reduced forms are less inhibitory to fermentative yeasts, such as *P. stipitis*.

Regarding the soluble products from acid-degradation of lignin, the spectra range among 320–400 nm is attributed to aromatic compounds having aromatic ring mediated conjugation between hydroxyl and carbonyl groups. The peak with a maximum at approximately 300 nm is characteristic of nonconjugated hydroxyl groups.⁸ In the present study the UV-profiles show for RSSH and OTHH reductions of 36 and 13% respectively, for both regions (300–350 nm). These results suggest a reduction in the low molecular weight phenolic compounds concentrations present in the hemicellulosic hydrolysates, which was not observed for the Folin-reagent methodology. This reduction in UV absorptivity was expected, since *S. cerevisiae* has the metabolic capacity to convert aldehyde and phenolic acid in their corresponding alcohols. Mathew et al.⁴⁰ indicated that the ferulic acid decarboxylation to produce 4-vinyl-guaiacol leads to an increase in the maximum UV-absorptivity in the 210 nm region. The authors suggested that this change is due to phenolic alcohol formation. Karmakar et al.⁴¹ analyzed the degradation product of the ferulic acid by employing the bacterium *Bacillus coagulans* and detected 4-vinyl-guaiacol as well as a decrease in UV absorptivity at the 290–310 nm regions.

Figure 2. Ultraviolet-spectrum profile before and after the biotransformation treatment by *Saccharomyces cerevisiae* in (a) RSHH and (b) OTHH. (blue) Untreated and (orange) treated.

On the other hand, the reduction percentages of phenol and furan compounds were higher at RSHH than OTHH. This may be explained attending to the different acetic acid concentrations in these hydrolysates. It is significant that a double acetic acid concentration in OTHH causes a half reduction of aromatic compounds compared with RSHH.

Although reductions in furan and phenolic compounds in the present study have not been completed, one advantage to using *S. cerevisiae* as the detoxifying agent is that this yeast does not consume the main sugar present in hemicellulose hydrolysates (D-xylose). Some studies of biological detoxification have reported total reduction of these toxic compounds, but also with consumption of pentoses. For example, Zhang et al.⁴² reported that *Amorphotheca resinae* ZN1 demonstrated the ability to degrade completely furans contained in corn stover hemicellulosic hydrolysate; however, the strain consumed 57% of D-xylose, making the method disadvantageous because the loss of this sugar compromises the subsequent fermentation step.

Effect of Biodetoxification on Ethanol Production. The treatment efficiency of hydrolysates with *S. cerevisiae* was evaluated by *Pichia stipitis* regarding the sugar consumption, cell growth and ethanol conversion (Figures 3 and 4). Figure 3 shows the sugars consumption by *P. stipitis* in RSHH and

Figure 3. Sugars consumption by *Pichia stipitis* in (a) RSHH and (b) OTHH treated (solid) by *Saccharomyces cerevisiae* and untreated (hollow). D-Glucose (square) and D-xylose (circle).

OTHH, respectively. D-Xylose consumption by *P. stipitis* was not observed in both untreated hemicellulose hydrolysates, and only 25% of the D-glucose was consumed in the OTHH, with no hexose consumption in the RSHH.

Once both hydrolysates were biodetoxified, D-glucose was completely consumed by *P. stipitis*. This consumption requires just less than 24 h for RSHH and 96 h for OTHH. The D-xylose consumption includes a lag phase of 24 h for RSHH and 48 h for OTHH. After this time, D-xylose consumption increased to approximately 55% after 96 h fermentation assays, with a consumption rate of approximately 0.49 and 0.16 g L⁻¹ h⁻¹ for RSHH and OTHH, respectively. In OTHH, it was observed that the D-glucose and D-xylose consumption occurred simultaneously, beginning after 48 h of the assay. This behavior was not observed by Agbogbo et al.⁴³ when growing *P. stipitis* CBS 6054 in media containing different proportions of these sugars (60.0 g L⁻¹ of total sugars). The authors found that first the yeast consumed all the D-hexose present in the medium to finally start D-xylose consumption, and the D-glucose consumption rate was always higher than that of D-xylose, as observed in the present study. This delay in sugar consumption can be associated with yeast adaptation phase in medium containing high acetic acid concentration. In the present study, the acetic acid initial concentration in OTHH was 4.1 g L⁻¹,

Figure 4. Biomass and ethanol production by *Pichia stipitis* in (a) RSHH and (b) OTHH treated (solid) by *Saccharomyces cerevisiae* and no-treated (hollow). Biomass (triangle) and ethanol (star).

which represents acid concentration of approximately 50% higher than in RSHH. Diaz et al.¹³ observed that the presence of acetic acid in a fermentation medium with D-glucose (20.0 g L⁻¹) and D-xylose (15.0 g L⁻¹) affects *P. stipitis* metabolism, even at the lowest concentration tested (3.0 g L⁻¹). Another study demonstrates that acetic acid concentrations of 3.5 g L⁻¹ completely inhibit the growth of *P. stipitis* and ethanol production.⁴⁴ According to Bellido et al.,⁴⁴ the D-xylose consumption was more affected by the acid presence than D-glucose, being more pronounced as the concentration of acetic acid increased. Another fact that would justify the low D-xylose consumption by *P. stipitis* in OTHH is the presence of D-glucose at higher concentrations which could lead to enzymes catabolic repression that utilize D-xylose.²⁹

Figure 4 shows that the biotransformation favored *P. stipitis* growth and ethanol production in both hydrolysates. These results can be explained by reduction in the total furan and phenolic concentration. It can be seen that the biotransformation improved *P. stipitis* growth by 4.5 and 3.6 times in RSHH and OTHH, respectively, compared with untreated results. The growth rate in treated-RSHH was approximately 0.08 g L⁻¹ h⁻¹, that is, 25% higher than observed for treated-OTHH, where we again observed an adaptation phase of near 48 h.

The ethanol production by *Pichia stipitis* during fermentation of the hemicellulosic hydrolysates also can be observed in

Figure 4. Ethanol productions (final minus initial concentration) of 8.3 and 5.9 g L⁻¹ in RSHH and OTHH, respectively, were observed. In the OTHH fermentation (Figure 4b) the ethanol concentration started with 1.2 g L⁻¹, and after 48 h decrease to 0.72 g L⁻¹, reaching 7.1 g L⁻¹ at the fermentation end time (96 h). According to Figure 4a, this profile was not observed for RSHH, *P. stipitis* produced 13.8 g L⁻¹ in the fermentative process. The ethanol effect in the D-glucose and D-xylose fermentability by *P. stipitis* was studied by Meyrial et al.⁴⁵ The authors demonstrated that the alcoholic fermentation of *P. stipitis* NRRL Y-7124 in a medium containing D-glucose or D-xylose (50.0 g L⁻¹), can be affected depending of the ethanol initial concentration. It was also observed that ethanol concentrations down to 10 g L⁻¹ do not affect yeast growth and ethanol volumetric production.

The fermentation parameters such as ethanol ($Y_{P/S}$) and biomass ($Y_{X/S}$) yield factors, ethanol volumetric productivity (Q_P) and ethanol efficiency (η) are given in Table 3. Ethanol

Table 3. Effect of Biodetoxification Method on Fermentation Parameters of the Rice Straw (RSHH) and Olive Tree (OTHH) Hemicellulosic Hydrolysates by *P. stipitis*

fermentative parameters ^a	RSHH		OTHH	
	untreated	treated	untreated	treated
$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	0	0.15	0.07	0.13
$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	0	0.17	0	0.14
Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0	0.09	0	0.06
η (%)	0	33.3	0	27.0

^aAverage of at least three determinations. Ethanol yield ($Y_{P/S}$), Biomass yield ($Y_{X/S}$), Ethanol volumetric productivity (Q_P), Efficiency (η).

yield factor (grams per gram) was defined as the ratio between ethanol concentration (grams per liter) and total substrate consumed (grams per liter). Ethanol volumetric productivity (grams per liter per hour) was calculated as the ratio between the ethanol concentration (grams per liter) and the fermentation time (hour). Cell yield factor (grams per gram) was defined as the ratio between cell concentration and total substrate consumed (grams per liter). The efficiency of sugar conversion to ethanol (η , %) was determined as the ratio between $Y_{P/S}$ (g g⁻¹) and the theoretical value (0.51 g g⁻¹) of this parameter.

The fermentations of biotransformation hydrolysates are characterized by quick kinetics with larger yield and productivity. The biomass yield increased approximately 46% in OTHH when compared with untreated hydrolysate. It was also verified that biomass and ethanol yields, and ethanol production efficiency in RSHH were approximately 15% superior to in OTHH. On the other hand, the ethanol volumetric productivity was 33% greater at RSHH than at OTHH, 0.09 and 0.06 g L⁻¹ h⁻¹, respectively. However, compared with the untreated hydrolysates, both had improved their fermentative parameters, since no ethanol production was observed for the untreated hydrolysates. As previously discussed, one explanation for the low ethanol productivity values obtained may be associated with the presence of acetic acid. According to Diaz et al.,¹³ in D-glucose (20.0 g L⁻¹) and D-xylose (15.0 g L⁻¹) medium, the acid acts more negatively in ethanol volumetric productivity than in *P. stipitis* growth. The authors observed that in the presence of 3.0 g L⁻¹ acetic acid the ethanol volumetric productivity was 22% lower than in the

control without acetic acid (0.38 and $0.49 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively). It was also observed that 6.0 g L^{-1} acetic acid completely inhibits the ethanol production in the 24 h fermentation process.

The results of this study showed that biological detoxification of RSHH and OTHH could be successfully performed by *S. cerevisiae*, thus removing and/or reducing the inhibitory compounds and allowing the ethanol production by *P. stipitis*.

In conclusion, sugars and toxic compound concentrations present in hemicellulose hydrolysates depend on the type of raw material as well as the conditions that have been employed in the hydrolysis. The method and the conditions of biotransformation process also should be specific for each hydrolysate. The biological detoxification of RSHH and OTHH by *S. cerevisiae* is a very interesting method because it reduces the inhibitory compounds without affecting the D-xylose levels in the medium. *S. cerevisiae* has a versatile and apparently inducible enzyme mechanism for biotransformation of inhibitory to less inhibitory compounds; thus, this yeast provides a new alternative for a biological treatment method. It is remarkable that to *P. stipitis* fermentation it is not necessary for the total removal of RSHH and OTHH by *P. stipitis*, the optimization of detoxification conditions is necessary, so that it can reduce the concentrations of aromatic compounds and acetic acid.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +55 12 3159 5026. Fax: +55 12 3153 3165. E-mail: ines@debiq.eel.usp.br.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support of "Ciência Sem Fronteiras" of the "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico" (CNPq), "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior" (CAPES) and "Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo" (FAPESP 12/51834-6) (Brazil) and the University of Jaén (Bioprocesses Research Group).

ABBREVIATIONS

RSHH, rice straw hemicellulosic hydrolysate; OTHH, olive tree hemicellulosic hydrolysate; $Y_{P/S}$, ethanol yield; $Y_{X/S}$, biomass yield; Q_P , volumetric ethanol productivity; 5-HMF, 5-hydroxymethylfurfural; UV, ultraviolet; η , efficiency

REFERENCES

- (1) Roberto, I. C.; Mussatto, S. I.; Rodrigues, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Ind. Crop. Prod.* **2003**, *17*, 171–176.
- (2) Moya, A. J.; Bravo, V.; Mateo, S.; Sánchez, S. Fermentation of acid hydrolysates from olive-tree pruning debris by *Pachysolen tannophilus*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2008**, *31*, 611–617.
- (3) Binod, P.; Sindhu, R.; Singhanian, R. R.; Vikram, S.; Devi, L.; Nagalakshmi, S.; Kurien, N.; Sukumaran, R. K.; Pandey, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4767–4774.

- (4) Hegde, S.; Hegde, V. Assessment of global rice production and export opportunity for economic development in Ethiopia. *Int. J. Sci. Res.* **2013**, 0021–8561.
- (5) Lim, J. S.; Manan, Z. A.; Alwi, S. R. W.; Hashim, A. A review on utilisation of biomass from rice industry as a source of renewable energy. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, *16*, 3084–3094.
- (6) Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.* **2002**, *83* (1), 1–11.
- (7) Mussatto, S. I.; Roberto, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review. *Bioresour. Technol.* **2004**, *93*, 1–10.
- (8) Silva, J. P.; Carneiro, L. M.; Roberto, I. C. Treatment of rice straw hemicellulosic hydrolysates with advanced oxidative processes: a new and promising detoxification method to improve the bioconversion process. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*, 23.
- (9) Monasterio, R. P.; Fernández, M. A.; Silva, M. F. Olive oil by capillary electrophoresis: Characterization and genuineness. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 4477–4496.
- (10) Ortega-García, F.; Blanco, S.; Peinado, M. A.; Peragón, J. Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. *Tree Physiol.* **2008**, *28*, 45–54.
- (11) Brenes, M.; García, A.; García, P.; Rios, J. J.; Garrido, A. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3535–3540.
- (12) De Leonadis, A.; Aretini, A.; Alfano, G.; Macciola, V.; Ranalli, G. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226*, 653–659.
- (13) Diaz, M. J.; Ruiz, E.; Romero, L.; Cara, C.; Moya, M.; Castro, E. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25* (5), 891–899.
- (14) Roberto, I. C.; Laci, L. C.; Barbosa, M. F. S.; Mancilha, I. M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. *Process Biochem.* **1991**, *26*, 15–21.
- (15) Chandel, A. K.; Kapoor, R. K.; Singh, A.; Kuhad, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 1947–1950.
- (16) Martinez, A.; Rodriguez, M. E.; Wells, M. L.; Sean, W. Y.; Preston, J. F.; Ingram, L. O. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnol. Program.* **2001**, *17*, 287–293.
- (17) Jönsson, L. J.; Palmqvist, E.; Nilvebrant, N. O.; Hahn-Hägerdal, B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 691–697.
- (18) Hou-Rui, Z.; Xiang-Xiang, Q.; Silva, S. S.; Sarrouh, B. F.; Ai-Hua, C.; Yu-Heng, Z.; Ke, J.; Qiu, X. Novel isolates for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *152* (2), 199–212.
- (19) Fonseca, B. G.; Moutta, R. O.; Ferraz, F. O.; Vieira, E. R.; Nogueira, A. S.; Baratella, B. F.; Rodrigues, L. C.; Hou-Rui, Z.; Silva, S. S. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 199–207.
- (20) Almeida, J. R. M.; Bertilsson, M.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Gorsich, S.; Lidén, G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 625–638.
- (21) Liu, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 809–825.
- (22) Browning, B. L. *Methods of Wood Chemistry*; Wiley and Sons: New York, 1967; p 882.
- (23) Mateo, S.; Puentes, J. G.; Roberto, I. C.; Moya, A. J.; Sánchez, S. A new approximation on olive pruning by-product characterization. *International Congress of Chemical Engineering (ICCE)*, Sevilla, 2012.
- (24) Silva, J. P.; Mussatto, S.; Roberto, I. C. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by