**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

BRUNO GUEDES FONSECA

**Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de
bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras
Issatchenkia occidentalis e *Issatchenkia orientalis***

Lorena
2009

BRUNO GUEDES FONSECA

**Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de
bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras
Issatchenkia occidentalis e *Issatchenkia orientalis***

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

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Silvério da Silva

Lorena
2009

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

Catálogo na Publicação

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

Fonseca, Bruno Guedes

Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis* / Bruno Guedes Fonseca ; orientador Silvio Silvério da Silva. – Lorena: 2009.

110 pág. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana 2. Biodestoxificação 3. Leveduras 4. Furanos 5. Compostos fenólicos. I. Título

577.152.3 - CDU

Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, meus pais, que sempre me estimularam a dar esse grande passo. Pessoas que estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória.

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer coisa é preciso ressaltar que meus agradecimentos não serão formais. Eu não me reconheceria neles se assim os fizesse. Espero não cometer injustiças esquecendo pessoas que acrescentaram vida aos meus dias, mas todos que realizam um trabalho de pesquisa sabem que não o fazem sozinhos. Quero agradecer a todas as pessoas que torceram por mim e se fizeram presentes, intelectual e emocionalmente. Este trabalho é feito por todos os professores que me orientaram e ensinaram, por todos os técnicos que tiveram paciência e zelo com este e todos os demais trabalhos desenvolvidos no departamento, por aqueles que mantêm limpo e organizado nossos laboratórios e instalações e pelos meus amigos e colegas que me fizeram aprender com as discussões e as conversas.

Um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Sílvio Silvério da Silva, pela oportunidade, empenho e compreensão.

Quero agradecer a minha querida amiga Rita. Paciência, ensinamentos e amizade são raros hoje em dia. E ao Nicanor (ou seria Nicamor?), por agüentar meu mau humor nas manhãs de segunda. Não teria como se esquecer de Zé e Nadir...e um delicioso aroma de café pelos corredores do departamento.

Ao Prof. Dr. Ismael Mancilha e a Prof^a. Dr^a Inês Roberto, os “papos com café” me mostraram que pesquisa pode ser algo leve e gostoso de fazer.

À Prof^a. Dr^a Maria das Graças e o Prof. Dr. Arnaldo Prata pela confiança e exemplos constantes.

A Sandra, Ana e Cida, pelo sorriso sempre estampado no rosto e sempre prontas a ajudar. E como eu dei trabalho!

A todo corpo docente do Departamento de Biotecnologia Industrial, muito obrigado.

As “fias”, Carol e Ju, minhas grandes amigas, por terem sido aquele ouvido nas horas de angústia e solidão. Vocês foram peças chaves em minha jornada em Lorena.

Ao meu amigo Flávio, pela paciência, compreensão e amizade.

Ao meu pequeno grande amigo Rondinele, que desde o início se fez presente, aparecendo e desaparecendo em questão de segundos.

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

Aos meus amigos Adriana, Paula, Priscila, Dani Cortez, Gina, Taís, Budaia, Pernambuco, Juan, Boutros, Sergim, Vitor, Japonês, Giovani, Vinícius, Wagner, Cláudio e Rafael, pelos grandes momentos de alegria, descontração e muita cerveja. Além Mar (Diana) você marcou demais também. Não somente a minha, mas a vida de muitos aqui.

Ao Bruno Baratella, pelo auxílio em cada etapa deste trabalho.

Ao Ricardo, Emílio, Erick, Andrei, Adriano e Thaís, pelos ótimos momentos no laboratório. Até aprendemos!

A minha tia Dey e meu primo Thiago, que sempre estenderam suas mãos para me ajudar nas horas mais turbulentas.

As minhas “irmãs”, Fla, Isa e Adair, que mesmo distantes torceram e foram fundamentais para o meu crescimento nesses últimos anos.

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 numa obrigação de a cada dia ser mais digno de fazer parte de vocês.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida durante os anos do curso.

RESUMO

FONSECA, B.G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. 2009. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

Este trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de um processo de destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098. Com este propósito, foi realizado testes com diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e diferentes condições experimentais para avaliar a influência do fator de concentração e pH inicial do hidrolisado, temperatura e agitação do sistema, na eficiência da redução na concentração de compostos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, sem a redução na concentração de açúcares. As leveduras avaliadas apresentaram os maiores valores de redução na concentração dos inibidores e uma menor perda de açúcares quando utilizado o hidrolisado com fator de concentração 5. Nestes experimentos foram constatados que o aumento na concentração de D-glicose e D-xilose favoreceram o menor consumo destes açúcares por estas leveduras. Foi observado também que após 24 h de ensaio empregando a levedura *I. occidentalis* a redução na concentração de siringaldeído (66,67%) e ácido ferúlico (73,33%) foi maior quando destoxificado o hidrolisado concentrado. Entretanto, nestas mesmas condições ao empregar a levedura *I. orientalis* foi verificado uma redução maior na concentração de 5-hidroximetilfurfural (80%) e furfural (56,25%). Com base no potencial de redução destes compostos inibidores em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar concentrado, foram realizados estudos para avaliar a influência do pH inicial do hidrolisado (4,0 a 7,0), temperatura (23 a 37°C) e agitação do sistema (100 a 300 rpm) na porcentagem de redução da concentração do total de inibidores, utilizando um planejamento fatorial 2^3 com 3 repetições no ponto central. De acordo com os resultados, verificou-se que independente do microrganismo utilizado como agente destoxificante do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar a maior porcentagem de redução na concentração dos inibidores totais foi obtida ao empregar todos os fatores avaliados em seus níveis inferiores. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram o potencial das leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 como agentes destoxificantes de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar. Biodestoxificação. Leveduras. Furanos. Compostos Fenólicos.

ABSTRACT

FONSECA, B.G. Biological detoxification of hemicellulosic hydrolysate of sugarcane bagasse using *Issatchenkia occidentalis* and *Issatchenkia orientalis* yeasts. 2009. 110 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

This work had as the main objective contribute for the development of a biological detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate using the *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 and *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 yeasts. With this aim, it was done tests with hemicellulosic hydrolysate of sugarcane bagasse in different concentrations and different experimental conditions to evaluate the influence of the hydrolysate concentration, initial pH of the hydrolysate, temperature and system agitation, on the efficiency of concentration reduction of inhibitory compound present in the sugarcane bagasse hydrolysate, without sugar concentration reduction. The evaluated yeasts showed more reduction values on the the inhibitors concentration and less sugar losses when it was used the hydrolysate five fold concentrated. At these experiments it was found that the concentration rise of D-glucose and D-Xylose favored a lower sugar consumption by the yeasts. It was also observed that after 24 h of experiment using *I. occidentalis* yeast the reduction of syringaldehyde concentration (66,67%) and ferulic acid concentration (73,33%) was higher when the concentrated hydrolysate was detoxified. However, under the same conditions using *I. orientalis* it was observed a higher reduction on the 5-hydroxymethylfurfural (80%) and furfural (56,25%). Based on the potential reduction of these inhibitors in concentrated sugarcane bagasse hydrolysate, it was performed studies to evaluate the influence of initial pH (4,0 or 7,0), temperature (23 to 37°C) and system agitation (100 to 300 rpm) on the reduction percentage of total inhibitors concentration, using a factorial experimental design 2^3 with three repetitions in the central point. According to the results, it was observed that independent of the microorganism used as detoxificant agent of the sugarcane bagasse hydrolysate, the largest reduction percentage of the total inhibitors concentration was obtained using all the factors evaluated in their low levels. The results obtained in this work showed the potential of the yeasts *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 and *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 as detoxificant agent of hemicellulosic hydrolysate of sugarcane bagasse.

Keywords: Hemicellulosic hydrolysate of Sugar Cane Bagasse. Biodetoxification. Yeasts. Furans. Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Compostos formados durante a hidrólise ácida de biomassa vegetal (PALMIQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000a)	25
Figura 2.2	Fórmula estrutural dos principais ácidos alifáticos presentes no hidrolisado ácido hemicelulósico	26
Figura 2.3	Fórmula estrutural dos principais furanos presentes no hidrolisado hemicelulósico	27
Figura 2.4	Fórmula estrutural dos principais compostos fenólicos presentes nos hidrolisado ácidos hemicelulósicos	30
Figura 2.5	Biodegradação de catecol e dos ácidos protocatecóico e gentístico até a formação de intermediários do ciclo de Krebs	31
Figura 5.1	Curva de crescimento celular (n° células/mL) da levedura <i>I. occidentalis</i> em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado (♦) e com fator de concentração cinco (Δ)	55
Figura 5.2	Curva de crescimento celular (n° células/mL) da levedura <i>I. orientalis</i> em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado (♦) e com fator de concentração cinco (Δ)	55
Figura 5.3	Curva de variação de pH durante o processo de destoxificação biológica quando cultivada a levedura <i>I. occidentalis</i> em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado (♦) e com fator de concentração cinco (Δ)	56
Figura 5.4	Curva de variação de pH durante o processo de destoxificação biológica quando cultivada a levedura <i>I. orientalis</i> em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado (♦) e com fator de concentração cinco (Δ)	57
Figura 5.5	Consumo de D-xilose pelas leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado	59
Figura 5.6	Consumo de D-xilose pelas leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco	59
Figura 5.7	Consumo de D-glicose pelas leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado	60
Figura 5.8	Consumo de D-glicose pelas leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco	60

Figura 5.9	Consumo de L-arabinose pelas leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado	61
Figura 5.10	Consumo de L-arabinose pelas leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco	61
Figura 5.11	Redução na concentração de ácido acético quando cultivadas as leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado	62
Figura 5.12	Redução na concentração de ácido acético quando cultivadas as leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco	63
Figura 5.13	Redução na concentração de 5-hidroximetilfurfural quando cultivadas as leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado	63
Figura 5.14	Redução na concentração de 5-hidroximetilfurfural quando cultivadas as leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco	64
Figura 5.15	Redução na concentração de furfural quando cultivadas as leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado	64
Figura 5.16	Redução na concentração de furfural quando cultivadas as leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco	65
Figura 5.17	Redução na concentração de ácido ferúlico quando cultivadas as leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado	66
Figura 5.18	Redução na concentração de siringaldeído quando cultivadas as leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado	67
Figura 5.19	Redução na concentração de ácido ferúlico quando cultivadas as leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco	67
Figura 5.20	Redução na concentração de siringaldeído quando cultivadas as leveduras <i>I. occidentalis</i> (♦) e <i>I. orientalis</i> (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco	68

Figura 5.21	Porcentagem de redução na concentração dos açúcares e dos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana original e com fator de concentração cinco após 24 h de destoxificação empregando levedura <i>Issatchenkia occidentalis</i> CCTCC 206097	69
Figura 5.22	Porcentagem de redução na concentração dos açúcares e dos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana original (HNC) e com fator de concentração cinco (H5C) após 24 h de destoxificação empregando a levedura <i>Issatchenkia orientalis</i> CCTCC 206098	70
Figura 5.23	Porcentagem de redução na concentração de açúcares totais (D-glicose e D-xilose) quando destoxificado o H5C com as leveduras <i>I. occidentalis</i> e <i>I. orientalis</i> nos diferentes ensaios do planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central	74
Figura 5.24	Porcentagem de redução na concentração do total de inibidores quando destoxificado o H5C com as leveduras <i>I. occidentalis</i> e <i>I. orientalis</i> nos diferentes ensaios do planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central	74
Figura 5.25	Diagrama de Pareto com os efeitos estimados do <i>screening</i> das variáveis significativas no nível de 90% de confiança para remoção de inibidores do hidrolisado de bagaço de cana pelas leveduras <i>I. occidentalis</i> (A) e <i>I. orientalis</i> (B) de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 com 3 repetições no ponto central	78
Figura 5.26	Superfície de resposta e curvas de nível dos modelos propostos que representa remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras <i>I. occidentalis</i> (A) e <i>I. orientalis</i> (B)	85
Figura 5.27	Diagrama de interpretação dos efeitos entre os Fatores temperatura, agitação e pH sobre a remoção de inibidores (%) do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras <i>I. occidentalis</i> (A) e <i>I. orientalis</i> (B) no planejamento completo 2^3	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Composição parcial (%) de diferentes resíduos agroindustriais	21
Tabela 2.2	Destoxificação biológica de diferentes hidrolisados hemicelulósicos	37
Tabela 4.1	Composição do meio semi-sintético utilizado para o crescimento do inóculo de <i>I. occidentalis</i> CCTCC M 206097 e <i>I. orientalis</i> CCTCC M 206098	45
Tabela 4.2	Suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para realização dos ensaios de biodestoxificação	46
Tabela 4.3	Codificação dos níveis para as variáveis avaliadas	47
Tabela 4.4	Matriz do planejamento fatorial 2 ³ para avaliação da influência das variáveis: temperatura, agitação do sistema e pH inicial do hidrolisado de bagaço de cana	48
Tabela 5.1	Composição parcial (g/L) dos principais componentes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido por hidrólise ácida, em sua forma original (HO) e após processo de concentração (FC 5)	52
Tabela 5.2	Composição parcial (g/L) do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado (HNC) e com fator de concentração cinco (H5C) após ajuste de pH (5,50 ± 0,20), autoclavagem e suplementação	53
Tabela 5.3	Redução da concentração (%) dos compostos presentes nos HNC e H5C após tratamento de biodestoxificação com as leveduras <i>Issatchenkia occidentalis</i> e <i>Issatchenkia orientalis</i>	58
Tabela 5.4	Composição parcial (g/L) do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana concentrado após ajuste de pH, autoclavagem e suplementação	71
Tabela 5.5	Concentração total (g/L) de açúcares e inibidores após 24 h de tratamento biológico com as leveduras <i>Issatchenkia occidentalis</i> CCTCC M 206097 e <i>Issatchenkia orientalis</i> CCTCC M 206098	72
Tabela 5.6	Matriz para a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras <i>I. occidentalis</i> e <i>I. orientalis</i> , apresentando os níveis codificados e naturais de um planejamento fatorial 2 ³ completo com 3 repetições no ponto central	77
Tabela 5.7	Análise de variância (ANOVA) para a remoção total de inibidores por <i>I. occidentalis</i> seguindo com planejamento fatorial 2 ³ completo com 3 repetições no ponto central	79

Tabela 5.8	Análise de variância (ANOVA) para a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por <i>I. orientalis</i> seguindo com planejamento fatorial 2^3 completo com 3 repetições no ponto central	80
Tabela 5.9	Análise de variância (ANOVA) após triagem dos fatores e interações não significativos a nível de 90 e 95% de confiança para remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela espécie <i>I. occidentalis</i> seguindo com planejamento fatorial 2^3 completo com 3 repetições no ponto central	81
Tabela 5.10	Análise de variância (ANOVA) após triagem dos fatores e interações não significativos a nível de 90 e 95% de confiança para remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela espécie <i>I. orientalis</i> seguindo com planejamento fatorial 2^3 completo com 3 repetições no ponto central	81
Tabela 5.11	Coefficiente de Regressão, Erros-Padrão, teste t de “Student” e níveis de significância do modelo estatístico para a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>I. occidentalis</i>	82
Tabela 5.12	Coefficiente de Regressão, Erros-Padrão, teste t de “Student” e níveis de significância do modelo estatístico para a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>I. orientalis</i>	82
Tabela 5.13	Análise de variância para o ajuste de um modelo estatístico aos dados da Tabela 5.6, que representa a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>I. occidentalis</i> em frascos agitados	83
Tabela 5.14	Análise de variância para o ajuste de um modelo estatístico aos dados da Tabela 5.6, que representa a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>I. orientalis</i> em frascos agitados	83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Matérias-primas lignocelulósicas	21
2.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar	23
2.2 Degradação de materiais lignocelulósicos	23
2.3 Mecanismo de inibição microbiana dos compostos tóxicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos	26
2.3.1 Ácidos Alifáticos	26
2.3.2 Compostos Furanos	27
2.3.3 Compostos fenólicos	29
2.4 Métodos de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos	32
2.4.1 Destoxificação biológica	35
2.5 As leveduras <i>Issatchenkia orientalis</i> e <i>Issatchenkia occidentalis</i>	38
2.5.1 A espécie <i>Issatchenkia orientalis</i>	39
2.5.2 A espécie <i>Issatchenkia occidentalis</i>	40
2.6 Principais fatores que influenciam o crescimento celular de leveduras	40
3 OBJETIVOS	42
3.1 Geral	42
3.2 Específico	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Obtenção e concentração do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	43
4.1.1 Hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar	43
4.1.2 Concentração do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	44
4.2 Processo de biodestoxificação	44
4.2.1 Microrganismos	44

4.2.1.1 Preparo do inóculo	45
4.2.2 Preparo do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	46
4.2.3 Avaliação da destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras <i>Issatchenkia occidentalis</i> CCTCC M 206097 e <i>Issatchenkia orientalis</i> CCTCC M 206098	46
4.2.3.1 Avaliação da concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar no processo de destoxificação biológica	46
4.2.3.2 Estudo da influência das variáveis: temperatura, agitação do sistema e pH inicial do hidrolisado na destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	47
4.3 Métodos analíticos	48
4.3.1 Determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar	48
4.3.2 Determinação da concentração celular	49
4.3.3 Determinação do pH	49
4.3.4 Determinação dos teores de açúcares e de ácido acético	49
4.3.5 Determinação dos teores de furfural, 5-HMF e compostos fenólicos	50
4.3.6 Determinação das concentrações dos produtos de decomposição da lignina solúvel em meio ácido	50
4.3.7 Determinação das porcentagens de redução dos compostos tóxicos e dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	51
4.3.8 Análise estatística	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar após hidrólise ácida e concentração	52
5.2 Processo de destoxificação biológica de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras <i>Issatchenkia occidentalis</i> e <i>Issatchenkia orientalis</i>	53
5.2.1 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	53
5.2.2 Efeito da concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar sobre a biodestoxificação	54
5.2.2.1 Avaliação do crescimento celular das leveduras <i>I. occidentalis</i> e <i>I. orientalis</i> em diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	54

5.2.2.2 Avaliação do pH durante o processo de destoxificação biológica em diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	56
5.2.2.3 Influência do tratamento na composição dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar	57
5.3 Análise estatística das variáveis estudadas no processo de biodestoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	71
5.3.1 Caracterização parcial dos hidrolisados hemicelulósicos concentrados submetidos à biodestoxificação	71
5.3.2 Influência das variáveis sobre a redução nas concentrações de açúcares e inibidores totais presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	72
5.5.1 Determinação dos modelos propostos para a remoção de inibidores por <i>Issatchenakia occidentalis</i> CCTCC M 206097 e <i>Issatchenakia orientalis</i> CCTCC M 206098	76
6 CONCLUSÕES	89
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICES	102

1 INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos representam uma das maiores fontes de carbono e energia renovável da Terra. Estes incluem vários resíduos agroindustriais como palhas, bagaços, cascas e cavacos, os quais são acumulados anualmente, provenientes da produção agrícola, beneficiamento de cereais e inúmeras outras transformações operadas com esses recursos naturais.

O acúmulo de tais resíduos gera problemas de origem ambiental e de cunho econômico, dado que a degradação destes representa a perda de potenciais recursos energéticos.

A utilização de materiais lignocelulósicos em processos biotecnológicos exige na maioria das vezes, etapas preliminares de preparação, mediante hidrólise química ou enzimática, para liberação das frações celulósicas ou hemicelulósicas, seja na forma de mono ou oligossacarídeos. Raros, porém não menos importantes, são os processos que empregam diretamente esses materiais em sua forma íntegra como nos cultivos em estado sólido.

O alto teor de pentoses, particularmente D-xilose, na fração hemicelulósica desses materiais, aliada à sua maior facilidade de extração do complexo lignocelulósico, tem atraído a atenção de pesquisadores para a efetiva utilização desta fração em processos de bioconversão.

A utilização dos hidrolisados hemicelulósicos como meios de cultivos para a bioconversão de D-xilose é dificultada pela presença de compostos tóxicos ao metabolismo microbiano, os quais são provenientes do processo de hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica. Em função das altas temperaturas e condições ácidas empregadas neste procedimento, furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), ácidos alifáticos e compostos fenólicos são produzidos atuando negativamente na fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos, podendo afetar o crescimento celular reduzindo assim a atividade enzimática e biológica das células microbianas. Tratamentos de destoxificação com resina de troca iônica, com carvão ativo, solventes orgânicos e alteração de pH são métodos comumente empregados que visam a redução total ou parcial desses compostos formados após a hidrólise ácida.

É importante identificar os potenciais inibidores presentes nos diversos tipos de hidrolisados hemicelulósicos antes de escolher um método ou uma seqüência de métodos de destoxificação. Este conhecimento ajuda não somente a escolher um método eficiente e de baixo custo como também estabelecer condições de hidrólises que minimizam a formação destes inibidores.

A destoxificação do hidrolisado hemicelulósico empregando-se microrganismos vivos que assimilam ácidos alifáticos, furanos e compostos fenólicos é um procedimento que merece destaque pelo fato de não gerar efluentes tóxicos ao meio ambiente e principalmente por observar pequena perda nas concentrações dos açúcares utilizados em posteriores fermentações. Além disso, é um método econômico, sem ou com pequena perda de volume do hidrolisado hemicelulósico e que remove seletivamente os inibidores em questão.

O presente trabalho teve por objetivo contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de destoxificação biológica da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, visando estabelecer condições adequadas ao processo de bioconversão desta fração para a produção de diversos bioprodutos. Para tanto, foi obtido o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando-se a hidrólise ácida diluída e destoxificado biologicamente com as leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Matérias-primas lignocelulósicas

Como consequência do desenvolvimento da agricultura e da indústria florestal é gerada a cada ano, milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos, os quais constituem fontes potenciais de energia e matérias-primas de baixo custo. Existe ainda um benefício ambiental no aproveitamento desses resíduos, tendo em vista que os mesmos representam poluentes ambientais potenciais (FULLER et al., 1996).

A utilização eficaz da biomassa lignocelulósica significa aproveitá-la de forma integral, adotando métodos e processos que transformem seus principais constituintes em produtos úteis, tanto para a produção de substâncias químicas, como para uma variedade de combustíveis alternativos (LYND et al., 2005).

Esta biomassa é constituída basicamente por celulose, hemicelulose, lignina e em menores proporções os extrativos como as graxas, gomas, amidos, alcalóides, resinas, óleos essenciais e outros constituintes citoplasmáticos; e os não-extrativos que incluem compostos como sílica, carbonatos e oxalatos (LYND et al., 2005). A Tabela 2.1 apresenta os principais constituintes e a composição parcial de diferentes subprodutos e resíduos agrícolas.

Tabela 2.1 - Composição parcial (%) de diferentes resíduos agroindustriais

Resíduos Agrícolas	Hexoses (%)	Pentoses (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana-de-açúcar	45	25	20
Palha de cevada	40	20	15
Sabugo de milho	42	39	14
Casca de amendoim	38	36	16
Palha de arroz	32	24	13
Casca de arroz	36	15	19
Palha de trigo	30	24	18

Fonte: KUHAD; SINGH, 1993.

A celulose, principal componente da parede celular da fibra vegetal, é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de D-glicose unidas entre si através de ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, com grau de polimerização de até 25.000 unidades.

Apresenta-se como uma estrutura micro-cristalina que dificilmente se dissolve ou hidrolisa sob condições naturais. A celulose envolve as células vegetais em arranjos paralelos regulares, mantidas juntas por uma matriz de outro material polimérico, a hemicelulose que apresenta maior solubilidade em água (FERREIRA-FILHO, 1994).

A hemicelulose é um heteropolímero formado pelas pentoses, D-xilose e L-arabinose, e pelas hexoses, D-glicose, D-manose e D-galactose e seus correspondentes ácidos urônicos, apresentando grau de polimerização inferior a 200 unidades. Sua composição varia amplamente, dependendo da espécie considerada, podendo preencher até 35% do material da parede celular da fibra vegetal atuando como substância de reserva e sustentação (SAHA et al., 2005).

A lignina, encontrada na parede celular de todas as plantas vasculares, é fração responsável pela rigidez e baixa reatividade dos materiais lignocelulósicos, constituída basicamente por polímeros de fenil-propano altamente irregulares e insolúveis, com unidades de *p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil, formados pela polimerização de três precursores principais: álcool trans-*p*-coumaril, álcool coniferil e álcool trans-sinapil (KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004).

O emprego dos diferentes polímeros obtidos a partir desses materiais requer a separação seletiva de cada uma das frações, utilizando técnicas de pré-tratamento, hidrólise e deslignificação (SAHA et al., 2005).

Diversos métodos são utilizados para recuperar os açúcares presentes na fração celulósica e hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos, dentre eles destacam-se a hidrólise ácida (ZHAO; WANG; LIU, 2008), a hidrólise alcalina (DAWSON; BOOPATHY, 2008) e a explosão a vapor (KUMAR et al., 2009), podendo após esta última realizar-se a hidrólise enzimática (PAN et al., 2005; KUMAR et al., 2009).

A hidrólise empregando ácido diluído consiste na fragmentação da fração hemicelulósica para utilização como fonte de carbono em processos de bioconversão, sendo os ácidos sulfúrico e clorídrico os agentes ácidos mais comumente empregados para este fim (AGUILAR et al., 2002). Neste tipo de hidrólise, a concentração do ácido e a temperatura são consideradas fatores críticos para a formação de compostos tóxicos como os ácidos alifáticos, os furanos e os compostos fenólicos resultantes da degradação dos açúcares e da solubilização parcial da lignina. Quando realizada em condições moderadas obtêm-se hidrolisados ricos em D-xilose e com baixa formação de inibidores, além de manter quase inalterada a fração celulósica e a lignina (HERRERA et al., 2003; LÓPEZ et al., 2004; SAHA et al., 2005).

2.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

Atualmente um dos subprodutos lignocelulósicos mais abundantes no Brasil é o bagaço de cana-de-açúcar. Este é constituído pelo material fibroso obtido após a moagem da cana para a extração do caldo. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), o volume total de cana-de-açúcar a ser processado pelo setor sucroalcooleiro na safra de 2009, deverá atingir 629,0 milhões de toneladas, o que corresponde a uma produção de bagaço de cana de aproximadamente 167,0 milhões de toneladas. Para o estado de São Paulo, estima-se para esta safra um volume de aproximadamente 342,0 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (UNICA, 2009).

Aproximadamente 80% do bagaço de cana gerado na indústria sucroalcooleira é utilizado como fonte de energia em substituição ao óleo combustível no processo de aquecimento das caldeiras e para a geração de energia elétrica (TEIXEIRA; PIRES; NASCIMENTO, 2007).

O bagaço de cana é composto por 45% de fibras lignocelulósicas, 50% de umidade e de 2 a 3 % de sólidos solúveis em água. Sendo a constituição química por grama de peso seco composta por 45% de celulose, 25% de hemicelulose e 20% de lignina; tendo a D-xilose com até 80% dos carboidratos presentes na fração hemicelulósica (PANDEY et al., 2000).

Dentre as possibilidades de utilização do bagaço de cana-de-açúcar em bioprocessos encontra-se a emprego da D-xilose presente na fração hemicelulósica desta matéria-prima como substrato para a produção de xilitol e/ou etanol (SILVA et al., 2003).

2.2 Degradação de materiais lignocelulósicos

Uma das desvantagens da hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos visando a liberação de açúcares fermentescíveis, é a geração de compostos tóxicos prejudiciais ao crescimento microbiano durante o desenvolvimento de processos fermentativos (PARAJÓ et al., 1998).

Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000b) descreveram três principais grupos de inibidores formados após hidrólise ácida do material lignocelulósico: ácidos alifáticos, furanos e compostos fenólicos. Tais compostos são resultantes da degradação dos carboidratos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos e da degradação e solubilização parcial da lignina causada pela ação do ácido e do calor no processo de hidrólise do material lignocelulósico (PARAJÓ et al., 1998).

Conforme Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000b), as altas temperaturas empregadas na etapa da hidrólise ácida são a principal causa da degradação dos açúcares originando alguns desses inibidores. Tais compostos, derivados do furano, o furfural e o 5-HMF, são formados pela degradação das pentoses (D-xilose e L-arabinose) e das hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose), respectivamente. O furfural por sua vez, pode se degradar posteriormente a ácido fórmico, e o 5-HMF em quantidades equimoleculares de ácidos fórmico e levulínico. Além destes ácidos alifáticos, forma-se também ácido acético, proveniente da hidrólise do radical acetila encontrado na estrutura hemicelulósica (Fig. 2.1).

Parte da lignina também se degrada originando uma grande variedade de compostos fenólicos. Os fenóis originados no pré-tratamento variam segundo o tipo de biomassa, considerando que existem grandes diferenças na lignina dependendo da espécie vegetal da qual esta provém. Esses compostos são considerados altamente tóxicos ao crescimento e ao mecanismo celular (DELGENES et al., 1996; DOMÍNGUEZ, 2003).

Figura 2.1 - Compostos formados durante a hidrólise ácida de biomassa vegetal (PALMIQVIST; HAHN HÄGERDAL, 2000a).

De acordo com Taherzadeh e colaboradores (2000), o tipo do material lignocelulósico utilizado e as condições operacionais empregadas na hidrólise ácida são os fatores que determinam as espécies tóxicas e suas concentrações no hidrolisado hemicelulósico.

A concentração máxima de cada inibidor encontrado nos hidrolisados hemicelulósicos e sua tolerância por microrganismos fermentativos dependem da espécie utilizada e sua adaptação ao meio, do tipo de processo de fermentação empregado, do número de inibidores presentes no meio e do seu efeito combinado (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

2.3 Mecanismo de inibição microbiana dos compostos tóxicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos

2.3.1 Ácidos Alifáticos

Os principais ácidos alifáticos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos são os ácidos acético, fórmico e levulínico (Fig. 2.2). O ácido acético é derivado dos grupos acetila liberados das xilanas acetiladas, e os ácidos levulínico e fórmico são produtos da degradação dos furanos (LUO et al., 2002).

Figura 2.2 - Fórmula estrutural dos principais ácidos alifáticos presentes no hidrolisado ácido hemicelulósico.

Os valores de pKa à 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. Nestas formas, os ácidos não dissociados são lipossolúveis e podem difundir-se através da membrana citoplasmática. Ao encontrar no citoplasma valores mais elevados de pH (~7,4), ocorre a dissociação destes ácidos, diminuindo assim o pH intracelular à valores inferiores aos limites fisiológicos (LOHMEIER-VOGEL et al., 1998). O desacoplamento da produção de ATP pela ATPase da membrana citoplasmática (LOHMEIER-VOGEL et al., 1998) e o acúmulo intracelular de ânions (RUSSEL, 1992) são os dois mecanismos sugeridos para explicar os efeitos inibitórios destes ácidos.

O primeiro mecanismo sugere que para se manter o pH intracelular constante, os prótons devem ser transportados através da membrana pela ação do ATPase da membrana plasmática. Isto resulta em um aumento do consumo do ATP, causando redução no rendimento de biomassa. (VERDUYN et al., 1990). Em concentrações suficientemente altas de ácido, há uma interferência na capacidade de bombeamento de prótons, acidificando assim o citoplasma, com posterior morte celular (LOHMEIER-VOGEL et al., 1998).

O acúmulo intracelular de ânions explica o efeito inibitório dos ácidos alifáticos, relacionando-o com a toxicidade do ânion, ou seja, enquanto os prótons são excretados ao

exterior os ânions são capturados e acumulados na célula, com posterior morte celular (TAHERZADEH, 1999).

Dentre os ácidos alifáticos, o ácido acético é o principal ácido presente nos hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal. Sua concentração depende do tipo de biomassa empregada e do processo de hidrólise utilizado, com variações de concentração de 0,6-12 g/L, e níveis de tolerância dos microrganismos a esse ácido podendo variar de acordo com as espécies e com as condições de cultivo empregadas (PEREGO et al., 1990; FELIPE et al., 1997; FENSKE; GRIFFIN; PENNER, 1998; HELLE et al., 2003).

2.3.2 Compostos Furanos

Furanos são compostos orgânicos heterocíclicos e aromáticos, transparentes, inflamáveis e de baixa solubilidade em água. Incluem as funções como aldeídos, cetonas, ésteres, alcoóis, éteres, ácidos e tiois, 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).

Alguns compostos pertencentes a esta classe e que serão citados neste trabalho são apresentados na Figura 2.3.

Figura 2.3 - Fórmula estrutural dos principais furanos presentes no hidrolisado hemicelulósico.

O furfural e o 5-HMF são os produtos gerados da degradação das pentoses e hexoses, respectivamente. Uma das hipóteses que explica o efeito tóxico dos compostos furanos é o fato de que por serem aldeídos quimicamente reativos, podem reagir com moléculas biológicas ou ocasionar danos à membrana celular (SANCHES; BAUTISTA, 1988). Entre os efeitos negativos produzidos pelo furfural e 5-HMF sobre os microrganismos em geral e as leveduras de fermentação alcoólica, está na degradação do furfural em acetaldeído, onde o

acúmulo intracelular do mesmo causa o aumento na fase “lag” de crescimento microbiano (TAHERZADEH, 1999; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000ab).

Poucos microrganismos foram citados como consumidores de furfural; entretanto, nos relatos encontrados encontram-se diferentes espécies, como por exemplo, as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e *Rhodococcus erythropolis*, e a levedura *Hyphozyma roseoniger* que degradam o furfural aerobicamente, enquanto *Desulfovibrio* e outras espécies crescem anaerobicamente em presença deste composto (WANG et al., 1994).

Os efeitos do furfural no metabolismo aeróbico de *Saccharomyces cerevisiae* e sua cinética de conversão foram estudados por Horváth e colaboradores (2003). Os mesmos autores demonstraram que o efeito inibitório do furfural nas células de levedura que crescem aerobicamente eram maiores que seu efeito em condições de anaerobiose.

Roberto et al. (1991), ao estudarem a produção de etanol por *Pichia stipitis* CBS 5773, observaram que concentrações de furfural acima de 2,0 g/L inibem o crescimento celular completamente, por outro lado, em concentrações abaixo de 0,5 g/L o furfural atua como fonte de carbono o que leva a um efeito positivo no crescimento celular. Segundo Nigam (2001), em cultivos de *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 para a produção de etanol com concentrações superiores a 1,5 g/L de furfural no meio fermentativo, há uma interferência negativa na respiração e no crescimento da levedura, porém em concentrações de 0,25 g/L esse inibidor não interfere significativamente no rendimento e na produtividade do processo. Estes autores demonstraram também que em altas concentrações de furfural, este é imediatamente reduzido para álcool furfurílico afetando negativamente na taxa de crescimento e na taxa específica de produção de etanol.

A formação do álcool furfurílico ou ácido furóico, dois possíveis produtos da conversão de furfural, podem estar associados às diferenças nas atividades enzimáticas e/ou nos níveis intracelulares dos metabólitos.

As reações 2.1 e 2.2 mostram a transformação do furfural a álcool furfurílico e ácido furóico realizada por uma enzima álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, respectivamente (HORVÁTH et al., 2003).

Considerando-se o 5-HMF, Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000a) reportaram que o efeito deste furano é considerado menos tóxico que o do furfural devido a sua baixa

concentração nos hidrolisados hemicelulósicos, já que apresentam pequena quantidade de hexose nestes hidrolisados.

2.3.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são moléculas de baixa solubilidade em água e que possuem um ou mais grupos hidroxilas ligados a um anel aromático, podendo apresentar grupos substituintes, como carboxilas, metoxilas e outras estruturas cíclicas não-aromáticas (NYCHAS, 1995).

As bactérias e os fungos desempenham um papel importante no metabolismo dos compostos aromáticos mono e policíclicos, tanto em cultura pura quanto em cultura mista, porém grande parte dos microrganismos não é capaz de utilizar os compostos aromáticos como única fonte de carbono e energia (CERNIGLIA, 1992).

Vários trabalhos relatam a degradação de hidrocarbonetos aromáticos e/ou fenólicos por microrganismos, abordando diferentes aspectos da degradação biológica a nível bioquímico, fisiológico e molecular (DUARTE et al., 2005).

Os compostos fenólicos de baixa massa molar são os que apresentam maior toxicidade aos agentes fermentativos. O modo de ação destes compostos é estabelecido considerando-se: (a) reação com a membrana celular causando aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; (b) inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas essenciais, incluindo as envolvidas no processo de produção de energia e síntese de componentes estruturais; ou (c) destruição ou inativação funcional do material genético (DAVIDSON; BRANEN, 1993; KIM et al., 1995; DUARTE et al., 2005).

O efeito tóxico dos aldeídos aromáticos pode estar relacionado à interação com determinadas zonas hidrofóbicas das células, causando perda da integridade da membrana, afetando assim sua capacidade de agir como uma barreira seletiva. Para os alcoóis aromáticos essa toxicidade é atribuída ao dano ocasionado por estes compostos na membrana plasmática, enquanto que para os ácidos aromáticos baseia-se em mecanismos semelhantes aos demais ácidos alifáticos (DUARTE et al., 2005).

ROSSELL (2006) relata que dentre os compostos fenólicos, o siringaldeído e o ácido sirínico são dois dos derivados mais abundantes nos hidrolisados lignocelulósicos, os quais são provenientes da degradação das unidades siringil-propano da lignina. O mesmo autor identifica também outros compostos fenólicos presentes em hidrolisados como o 4-hidroxibenzaldeído, o ácido gentístico, o ácido protocatecóico, a vanilina e o ácido vanílico, o catecol, o guaiacol, a hidroquinona, o aldeído coniferílico e o ácido homovanílico (Fig. 2.4).

Figura 2.4 - Fórmula estrutural dos principais compostos fenólicos presentes nos hidrolisado ácidos hemicelulósicos.

Alguns microrganismos apresentam o metabolismo dos compostos fenólicos dividido em dois estágios: oxidação do anel benzênico formando cis-diidrodiol, seguida da rearomatização do cis-diidrodiol formando um dos derivados dihidroxilados - catecol, ácido protocatecóico ou ácido gentístico (DOTEN et al., 1987).

A oxidação permite a incorporação da molécula de oxigênio ao anel benzênico formando cis-diidrodiol, catalisada por enzimas do grupo oxigenases (HADDOCK; GIBSON, 1995). 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. 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).

A Figura 2.5 demonstra resumidamente a biodegradação dos compostos fenólicos após a formação dos três possíveis intermediários diidroxilados o que leva à formação de intermediários do ciclo de Krebs.

Figura 2.5 - Biodegradação de catecol e dos ácidos protocatecólico e gentístico até a formação de intermediários do ciclo de Krebs (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 (DAGLEY, 1975).

Observa-se também um terceiro tipo de via metabólica, denominada via orto-modificada ou via do gentisato. 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 (GIBSON, 1984).

Devido a 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).

Visando avaliar o efeito dos produtos de degradação da lignina sobre a bioconversão de D-xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, Cortez (2005) selecionou dois aldeídos aromáticos (vanilina e siringaldeído) como compostos modelo. Os resultados mostraram que em ambos os valores de pH avaliados (5,5 e 7,0), a presença de vanilina e siringaldeído no meio fermentativo promoveu a completa inibição do crescimento celular, o que negativamente afetou o bioprocesso. Foi verificado ainda que independentemente do pH adotado, a presença de somente vanilina (2,0 g/L) no meio fermentativo não influenciou significativamente o rendimento em xilitol, mas por outro lado, o siringaldeído (2,0 g/L) fortemente afetou o consumo da xilose e a produção de xilitol, sendo este efeito inibitório mais pronunciado em pH 7.

2.4 Métodos de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos

Com a finalidade de melhorar o potencial dos hidrolisados hemicelulósicos para posterior utilização em processos de bioconversão, vários tratamentos têm sido utilizados para remover ou reduzir as concentrações dos compostos tóxicos presentes nos meios fermentativos, visando a superação do efeito negativo destes inibidores nos hidrolisados (ZALVIDAR; NIELSEN; OLSSON, 2001; MODIG; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002; CARVALHO et al., 2006). Os métodos de tratamento do hidrolisado hemicelulósico podem ser classificados em função da forma (individual ou combinado) e da natureza dos agentes empregados (biológico, químico e físico) (MARTÍN et al., 2002). Tratamentos com alteração

de pH (dU PREEZ, 1994) e com carvão ativo (ALVES, 2001), uso de solventes orgânicos (PALMIQVIST; HANH-HÄGERDAL, 2000a) e resinas de troca iônica (CARVALHO et al., 2006), são alguns dos procedimentos utilizados para a destoxificação dos hidrolisados hemicelulósicos para melhor fermentabilidade desses hidrolisados de forma a ampliar as suas aplicações tecnológicas.

Um tratamento comumente empregado em hidrolisados ácidos hemicelulósicos é o método químico de alteração de pH. Millati et al. (2002), estudaram a variação de pH, tempo e temperatura utilizados no processo de destoxificação por alteração de pH quando utilizado hidrolisado hemicelulósico de resíduos florestais. Estes autores corroboraram que estas variáveis podem afetar os resultados do processo de destoxificação, assim como as concentrações dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico. Além disso, demonstraram que o efeito da temperatura não é tão significativo quanto os efeitos de tempo de processo e pH. À medida que aumentavam o valor de pH com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e o tempo de tratamento, a precipitação dos íons Ca^{2+} adsorvia de forma mais efetiva os inibidores presentes, aumentando-se também a fermentabilidade do hidrolisado. Foi observado também, que independente da temperatura empregada (25°C ou 60°C), as maiores remoções de furfural e 5-HMF (> 90%) foram conseguidas elevando-se o pH até 12 em um período de 20 ou 170 horas de tratamento. Porém, quando utilizado o pH 12, a diminuição nas concentrações de açúcares foi mais acentuada, chegando a uma perda de 32 e 74% de D-glicose e D-xilose respectivamente, quando tratados a 25°C por 20 horas. O efeito mais significativo da metodologia empregada nesta pesquisa foi a diminuição acentuada na concentração dos furanos, considerando que a concentração de ácido acético permaneceu inalterada e houve uma diminuição de apenas 30% na concentração de compostos fenólicos.

Como outro exemplo de tratamento químico, pode-se citar a metodologia empregando solventes orgânicos como agentes extratores de alguns inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos e o método físico-químico utilizando resinas de troca iônica. Frazer e McCaskey (1989) descreveram que o tricloroetileno e o benzeno são os melhores compostos capazes de extrair o ácido acético. Contudo, apenas 40% da concentração dos compostos fenólicos foram removidos utilizando solventes como agentes extratores, uma fração pequena quando comparado a outros métodos como o uso de carvão ativo – que eliminou 73%, ou o uso de resinas de adsorção – com 53 % a 71% de remoção. Viñals (2001) utilizando diferentes resinas de troca iônica no tratamento de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para

obtenção biotecnológica de xilitol, encontrou máxima produtividade volumétrica (0,679 g/Lh) quando tratado com as resinas aniônicas A-860S e A-500, seguida da catiônica C-150 e finalizada com a resina aniônica fraca A-103S. Obteve-se remoção total de ácido acético, furfural e 5-HMF, 86,44% na remoção de fenóis e 97,48% na remoção de cor.

A concentração do hidrolisado por evaporação à vácuo é um método físico de destoxificação que reduz significativamente compostos voláteis como o ácido acético, o furfural e alguns compostos fenólicos como a vanilina. Entretanto, este método aumenta moderadamente a concentração de alguns compostos tóxicos derivados da lignina aumentando assim, o grau de inibição na fermentação. Ao empregar o método de evaporação à vácuo seguido do uso de carvão ativado, Rodrigues e colaboradores (2001) demonstraram uma remoção de 98% de furfural no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

Quando tratado o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com diferentes tipos de carvão ativo, Mussato e Roberto (2004) demonstraram que a bioconversão de D-xilose em xilitol, pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 é influenciada pelo tipo de carvão ativo utilizado na etapa de tratamento do hidrolisado. A condição ideal foi conseguida com a combinação do pH 2,0, 150 rpm, 45°C por 60 minutos. Nesta condição a redução na concentração dos compostos fenólicos foi de 25,8% e a produção de xilitol, produtividade volumétrica e o fator de rendimento foram de 66,0 g/L, 0,57 g/L.h e 0,72 g/g, respectivamente.

Adsorção com resinas de troca iônica tem demonstrado ser uma técnica eficiente na remoção dos inibidores presentes nos hidrolisados. Entretanto, o alto custo desta técnica inviabiliza seu uso industrial. O tratamento de hidrolisado hemicelulósico pelo sistema combinado, formado por carvão ativo e resinas de troca iônica, demonstra ser uma metodologia que favorece a fermentabilidade do hidrolisado. Carvalho e colaboradores (2006) avaliaram diferentes condições de tratamento combinados do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto e verificaram que a melhor taxa de remoção dos inibidores foi obtida com o hidrolisado após etapa de concentração e submetidos em seguida ao processo de adsorção em carvão ativo e adsorção em resina aniônica Purolite MN-150. Segundo estes autores a remoção foi de 82,5 e 94% nas concentrações de ácido acético e fenóis totais respectivamente, e em sua totalidade para o 5-HMF e furfural.

Um processo que atualmente merece destaque é a extração dos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico utilizando-se membranas. Metodologia que além de remover estes inibidores pode ser aplicada para ajustar o pH do meio para valores mais viáveis à fermentação. Grzenia et al. (2008), empregaram membranas de fibra oca de polipropileno em

dois tipos diferentes de módulos para o tratamento de hidrolisados hemicelulósicos de fibra de milho na expectativa de retirar o ácido acético do meio. Estes autores utilizaram como fase orgânica octanol adicionando Alamine 336 e Aliquat 336 como extrativos. O ácido acético foi extraído pela fase orgânica sob um pH menor que seu valor de pK_a . Os resultados demonstraram que 60% do ácido acético foram removidos usando Alamine 336. Observaram também a remoção de alguns compostos fenólicos.

2.4.1 Destoxificação biológica

A destoxificação biológica ou biodestoxificação é um procedimento que consiste no emprego de microrganismos ou enzimas capazes de metabolizar alguns ou todos os compostos tóxicos presentes em efluentes industriais e hidrolisados lignocelulósicos. Dentre os microrganismos usados com essa finalidade destacam-se os fungos filamentosos, as leveduras e as bactérias.

Estudos recentes têm demonstrado a habilidade de algumas espécies de bactéria em degradar e destoxificar ambientes contaminados com compostos fenólicos e furanos. Dentre essas espécies encontram-se as bactérias redutoras de sulfatos, metanogênicas, algumas termófilas entre outras. Embora algumas bactérias sejam conhecidas por degradar furfural e outros furanos, a presença destes compostos em altas concentrações ($> 1,0$ g/L) em efluentes industriais, tem demonstrado inibição no crescimento de algumas espécies (BOOPATHY et al., 1993). Porém, resultados satisfatórios no tratamento de efluentes industriais contendo elevadas concentrações de compostos fenólicos foram apresentados por González et al. (2001). Utilizando culturas imobilizadas de *Pseudomonas putida* ATCC 17484 em biorreator de leito fluidizado, estes autores observaram uma eficiência de 90% na degradação de alguns compostos fenólicos.

Boopathy et al. (1993), demonstram a capacidade de biotransformação de furfural e 5-HMF por diversas bactérias entéricas, entre elas algumas dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus* entre outras. Em ensaios utilizando apenas o furfural e o 5-HMF (1,0 g/L) como fonte de carbono e energia, os autores não observaram crescimento celular. Contudo, quando suplementado o meio com D-glicose e peptona as espécies foram

capazes de transformar o furfural e o 5-HMF em seus respectivos alcoóis. A maior porcentagem de biotransformação do furfural foi de 91,5% quando utilizados cepas de *Escherichia coli* ATCC 1175 e do 5-HMF foi de 94,4% quando utilizados a espécie *Edwardsiella* sp.

As bactérias metanogênicas têm recebido destaque em tratamentos de efluentes de processos industriais. Belay et al. (1997), investigaram o metabolismo do furfural por uma dessas bactérias sob condições anaeróbicas, e os resultados mostraram uma grande habilidade da linhagem de *Methanococcus deltae* ΔLH de converter furfural em álcool furfurílico em meio sintético. Através de análises por cromatografia líquida os autores confirmaram a presença de álcool furfurílico no meio estudado. Após 48 h, a concentração inicial de furfural de 1,0 g/L reduziu a zero, simultaneamente um aumento na concentração de álcool furfurílico foi observado, atingindo concentrações de 0,90 g/L. Em concentrações acima de 1,4 g/L de furfural a transformação em seu respectivo álcool foi de apenas 50%.

As bactérias *Arthrobacter protophormiae* RKJ 100 e *Burkholderia cepacia* RKJ 200, isoladas de solos contaminados por pesticidas, são capazes de metabolizar ácido p-hidroxibenzóico como única fonte de carbono e de energia. O produto de clivagem do anel aromático do ácido é convertido aos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (DEBARATI, 2004).

Yu et al. (2004), mostraram que compostos fenólicos podem ser consumidos por bactéria do gênero *Acinetobacter*, espécie de grande potencial no campo da biodegradação. Estes autores realizaram experimentos de destoxificação em meios definidos suplementados com compostos fenólicos usando cinco diferentes cepas identificadas por: *A. calcoaceticus* PHEA-2, *A. baumannii* UMI-95, *A. lwoff* UMI-8, *A. junii* UMI-85 e *Acinetobacter* sp. MM1. Os resultados mostraram que as cepas PHEA-2 e UMI-95 apresentaram desempenho favorável para degradar benzoato, ferulato, vanilina, vanilato e fenol. A bactéria *Acinetobacter* sp. MM1 degradou somente ácido vanílico, e as espécies *A. lwoff* UMI-8, *A. junii* UMI-85, não degradou nenhum dos compostos.

A Tabela 2.2 apresenta algumas espécies de microrganismos que já foram pesquisadas como possíveis agentes de destoxificação de diferentes hidrolisados hemicelulósicos de resíduos e subprodutos agro-industriais.

Tabela 2.2 - Destoxificação biológica de diferentes hidrolisados hemicelulósicos

Microrganismos	Hidrolisado Hemicelulósico	Referência
<i>Trichoderma reesei</i>	Salgueiro	PALMQVIST et al., 1997
<i>Trametes versicolor</i>	Salgueiro	JÖNSSON et al., 1998
<i>Coniochaeta ligniaria</i> NRRL 30616	Palha de milho	NICHOLS et al., 2008
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i> NCIMB 13819	Madeira	OKUDA et al., 2008
<i>Issatchenkia occidentalis</i> CCTCC M 206097	Bagaço de cana	HOU-RUI et al., 2008
<i>Issatchenkia orientalis</i> CCTCC M 206098	Bagaço de cana	HOU-RUI et al., 2008

Okuda et al. (2008), estudaram a inibição dos componentes tóxicos provenientes de hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos na produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* recombinante KO11. Investigaram a destoxificação biológica de hidrolisado de madeira pela bactéria termofílica – *Ureibacillus thermosphaericus* NCIMB 13819. Os resultados mostraram que esta bactéria inicialmente degradou os compostos fenólicos do hidrolisado de madeira por apresentar as enzimas lacase e peroxidase. Com isso sugeriram a destoxificação biológica seguida do procedimento de alteração de pH, para remoção dos compostos tóxicos que não foram removidos com o tratamento biológico.

Os fungos do gênero *Chaetomium*, *Humicola*, *Petriellidium* e *Phialophora* (*Lecythophora*) são conhecidos por consumir compostos aromáticos de baixo peso molecular, formados a partir da degradação da lignina após o tratamento de hidrólise ácida. Diante desse fato, Bugos et al. (1988), em seus experimentos investigando a utilização dos compostos fenólicos de baixo peso molecular por fungos *Lecythophora hoffmannii* ATCC 34158, concluíram que a espécie possui atividade enzimática para metabolizar os compostos fenólicos via ácido protocatecóico, particularmente ácido p-hidroxibenzóico, ácido vanilínico e vanilina, produtos derivados da degradação da lignina.

Durante o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de salgueiro com o fungo filamentoso *Trichoderma reesei*, observou-se a redução na concentração de compostos como ácido acético, furfural e ácido benzóico (PALMQVIST et al., 1997). Outro fungo comumente empregado em processos de destoxificação biológica é o *Trametes versicolor*. Segundo Jönsson et al. (1998), o complexo enzimático (peroxidase e lacase) encontrado neste fungo

atua principalmente nos monômeros fenólicos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de salgueiro polimerizando esses compostos de baixa massa molar a compostos aromáticos de maiores massas molares com menor toxicidade. Estes autores demonstraram experimentalmente um aumento de 50% na produtividade máxima em etanol ao destoxificar o hidrolisado com este microrganismo.

O fungo do gênero *Coniochaeta ligniaria* NRRL 30616 também tem sido utilizado em processos de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos. Este microrganismo é capaz de degradar produtos tóxicos como o furfural, o 5-HMF bem como ácidos e aldeídos aromáticos encontrados em hidrolisados hemicelulósicos de palha de milho sem grandes perdas dos açúcares fermentescíveis presentes no meio (NICHOLS et al., 2008).

O uso de leveduras como agentes destoxificantes ainda não tem sido amplamente discutido. Hou-Rui et al. (2008), relataram o uso das linhagens *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 como agentes destoxificantes de hidrolisado ácido hemicelulósico de biomassa vegetal. Em seus experimentos, os autores demonstraram a capacidade das espécies em metabolizar alguns dos compostos tóxicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar prejudiciais ao metabolismo de diversas leveduras fermentativas. Os resultados da fermentação após a destoxificação biológica do hidrolisado mostraram um aumento na produtividade de xilitol de 1,95 e 1,97 vezes maior (2,01 g/Lh e 2,03 g/Lh) e no rendimento de xilitol de 1,65 e 1,72 vezes (0,89 e 0,93 g xilitol/g D-xilose) para o hidrolisado tratado com as espécies *I. occidentalis* e *I. orientalis*, respectivamente, em comparação ao hidrolisado não tratado (1,03 g/Lh e 0,54 g xilitol/g D-xilose). Este trabalho demonstra a importância das espécies *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis* na eficácia da remoção de inibidores e melhoria na fermentabilidade do hidrolisado conduzindo desta forma a uma elevada produtividade e rendimento de xilitol.

2.5 As leveduras *Issatchenkia orientalis* e *Issatchenkia occidentalis*

As primeiras cepas da levedura *Issatchenkia* foram isoladas de sucos e bagaços de frutas, descritas por Kudriavzev (1960) como células elipsoidal, esferoidal ou alongada (2,7 a 6,0 µm por 3,5 a 13,5 µm), com esporos arredondados de parede lisa e formados por ascos. Seus esporos germinam para produção de células vegetativas sem conjugação. São leveduras

fermentadoras de D-glicose, mas não fermentam galactose, sacarose, maltose e lactose. Assimilam etanol, glicerol, ácido láctico, ácido succínico e ácido cítrico, mas não assimilam sacarose, galactose, maltose, D-xilose, nitrato entre outros. Ambas as espécies crescem à 37°C, porém foi observado crescimento à 40°C somente para a espécie *Issatchenkia orientalis* (KURTZMAN et al., 1980).

Após estudos da morfologia dos ascos, outras espécies de *Issatchenkia* foram descritas, inicialmente com a *Issatchenkia orientalis*, seguida por *Issatchenkia occidentalis*, *Issatchenkia scutulata* e *Issatchenkia terrícola* (KURTZMAN et al., 1980).

2.5.1 A espécie *Issatchenkia orientalis*

As leveduras da espécie *I. orientalis* apresentam micélio verdadeiro e uma fina película envoltória em sua membrana quando em presença de meio líquido.

A capacidade de fermentação para produção de vinho e o consumo de ácido málico pela linhagem de *Issatchenkia orientalis* KMBL 5774 foi investigada por Kim et al. (2008). Durante a fermentação as mudanças nas concentrações de álcool e ácido málico foram comparadas com as obtidas pela *S. cerevisiae* W-3, principal levedura utilizada na produção industrial do vinho. Quando comparadas as duas cepas, o nível de produção de álcool pela *I. orientalis* foi inferior ao da *S. cerevisiae*, apresentando uma produção máxima de álcool de 5,8% (v/v) após 15 dias de fermentação, enquanto a cepa de *S. cerevisiae*, após 10 dias de fermentação, alcançou um nível máximo de 7,8% (v/v) de álcool. Contudo, quando comparado a redução dos níveis de ácido málico, a levedura *I. orientalis* demonstrou ser mais eficiente. Após 15 dias de fermentação as concentrações de ácido málico foram de 1,1 e 0,31 mg/mL para *S. cerevisiae* e *I. orientalis*, respectivamente. Os dados obtidos em experiências preliminares sugerem que a levedura *I. orientalis* KMBL 5774 não é apropriada para a fermentação da uva para produção de vinho, porém poderia ser utilizada para a degradação do ácido málico presente no vinho.

2.5.2 A espécie *Issatchenkia occidentalis*

Após 3 dias de incubação a 25°C, as células da espécie *Issatchenkia occidentalis* apresentam-se na forma de ovóides para alongadas (2,2 a 4,3 µm por 3,2 a 9,3 µm), com colônias de coloração rosa clara. Com 7 dias de incubação em placas contendo ágar a 25°C, mostram-se abundantes e moderadamente bem ramificadas, franjadas e com pseudo-hifas. Em crescimento aeróbico a colônia apresenta-se com coloração branca ou branca tanino, com pequena elevação no centro. Apresentam bordas inteiras, finamente serradas ou com pequenos lóbulos. O processo de esporulação é lento, podendo a 25°C, durar semanas. São formados um ou dois ascósporos esferoidais em cada asco persistente e desconjugado (KURTZMAN et al., 1980).

Estudos com a levedura *Issatchenkia occidentalis* PYCC 5770 demonstraram que a descoloração dos corantes previamente testados, em meio líquido contendo 0,2 mM de corante do tipo azo e 2% de D-glicose, atingiu mais de 80% num período de 15 horas, especialmente em condições microaerófilas. Ensaio cinéticos da atividade de azo redutase demonstraram que o pH ótimo depende da estrutura do corante e situa-se numa faixa ácida e a atividade máxima de descoloração ocorreu durante a fase exponencial variando com a temperatura. Os melhores resultados de descoloração foram observados em pH 3,0, numa faixa de temperatura de 18-50°C e com concentrações de oxigênio menores que 0,2 mg/L. Observou-se também que a maior taxa de atividade descorante ocorreu na fase exponencial de crescimento, entre 5 e 12 h. Em uma temperatura acima de 50°C houve perda na atividade descorante das células (RAMALHO et al., 2004).

2.6 Principais fatores que influenciam o crescimento celular de leveduras

Todos os processos de crescimento são dependentes de reações químicas, as quais são afetadas pela temperatura, pH, agitação, aeração e composição do meio (BORZANI et al., 2001). Para as leveduras em geral, esses fatores de crescimento podem atuar como estimulantes proporcionando uma maior velocidade de crescimento celular (ROSE; HARRISON, 1987).

A temperatura é um dos principais fatores físicos que influencia no crescimento, no metabolismo e na sobrevivência das leveduras. O crescimento microbiano é dependente de três faixas de temperaturas: temperatura mínima e máxima, onde abaixo e acima, respectivamente, não há crescimento; e temperatura ótima de crescimento, apresentando nesta faixa um crescimento máximo. Os fatores que determinam as temperaturas de crescimento dos microrganismos incluem a síntese e atividade enzimática, mecanismos celulares de controle, transferência de informações anabólicas dos genes aos ribossomos e integridade da membrana semipermeável da célula (BORZANI et al., 2001). A maioria das leveduras apresenta como temperatura ótima de crescimento valores que se encontram dentro da faixa de 20-30°C, contudo, algumas podem apresentar como temperatura máxima limites superiores a 40°C (MOAT et al., 2002; NCYC, 2007). A temperatura afeta a expressão de genes que codificam a síntese de enzimas responsáveis pelo catabolismo de fontes de carbono, sendo associada também à esporulação das leveduras, ocorrendo na maioria dos casos perto da temperatura máxima de crescimento (BORZANI et al., 2001). Koh e colaboradores (2008) em estudos com a espécie *Issatchenkia orientalis* Y266 demonstraram que as cepas apresentavam um maior crescimento e resistência quando em contato com meios ácidos em uma temperatura constante de 37 °C.

Assim como a temperatura, o pH apresenta faixas de valores ótimo, mínimo e máximo. Grande parte dos microrganismos apresenta seu pH ótimo em torno da neutralidade, entretanto, alguns podem desenvolver suas atividades em limites extremos. Por apresentar importante papel em sínteses enzimáticas, transporte e assimilação de substratos, o ajuste e controle de pH são fundamentais para o crescimento celular (BORZANI et al., 2001). Em estudos com a levedura *Issatchenkia orientalis* KMBL 5774 com o propósito de degradar ácido málico, Seo et al. (2007) avaliaram o crescimento celular e degradação de ácido málico e concluíram que os melhores resultados foram obtidos em pH 2-3.

Outros fatores que afetam diretamente a característica e o crescimento das leveduras é a disponibilidade de oxigênio, nutriente importante principalmente para organismos aeróbicos ou aeróbicos facultativos; e a agitação, que permitirá uma maior aeração do meio e conseqüentemente um favorecimento no crescimento aeróbico e aeróbico facultativo, podendo promover uma homogeneização dos nutrientes no meio de cultura e dispersão dos produtos metabólicos (BORZANI et al., 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Contribuir para o desenvolvimento de um processo de destoxificação biológica da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar.

3.2 Específicos

Avaliar a destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098.

Avaliar a influência do fator de concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar na eficiência da destoxificação biológica objetivando maior redução de compostos inibidores e menor perda de açúcares.

Avaliar a influência do fator de concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar no crescimento celular e no consumo dos açúcares pelas leveduras utilizadas na biodestoxificação.

Avaliar as condições experimentais (pH, temperatura e agitação) da biodestoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com melhor fator de concentração.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios do GMBIO do Departamento de Biotecnologia Industrial da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo de acordo com o fluxograma apresentado no Apêndice E.

4.1 Obtenção e concentração do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

4.1.1 Hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, doado pela Usina “São Francisco” – Sertãozinho/SP foi exposto ao sol para secagem e em seguida armazenado em sacos de 50 Kg. Foi determinado o teor de umidade do bagaço para auxiliar nos cálculos de dosagem de ácido necessário ao processo de hidrólise ácida.

Antes da operação de obtenção do hidrolisado hemicelulósico, o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi caracterizado quimicamente seguindo a norma proposta por Rocha (2000).

A hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em um reator de aço inox (AISI 316) com volume útil de 350 L, aquecido indiretamente por resistência elétrica por meio de uma camisa de óleo. Uma vez preparado, o reator foi operado em regime descontínuo empregando-se as seguintes condições de hidrólise: temperatura de 121°C; tempo de reação de 10 minutos, a uma agitação de 50 rpm e pressão manométrica de 180 KPa, 100 mg de ácido sulfúrico (98%p/p) para 1 g de bagaço de cana-de-açúcar (matéria seca) em uma proporção entre massa seca de bagaço e volume de solução ácida de 1:10. Foram realizadas duas operações de hidrólise e em seguida uma filtração para separar os resíduos sólidos constituídos de celulignina. Posteriormente, o hidrolisado foi transferido e armazenado em bombonas de 50 L.

O hidrolisado foi caracterizado antes e após as etapas de concentração quanto ao pH, fenóis totais e aos teores de D-glicose, D-xilose, L-arabinose, ácido acético, furfural, 5-HMF, ácido ferúlico e siringaldeído.

4.1.2 Concentração do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Uma parte do hidrolisado foi submetido ao processo de concentração à vácuo $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ visando aumentar o teor de açúcares, principalmente a D-xilose. Este processo ocorreu em concentrador à vácuo (SPENCER SCIENTIFIC) com 28 litros de capacidade nominal operado de forma descontínua. O hidrolisado original (HO) foi concentrado pela redução de 1/5 (FC5) de seu volume inicial. Os hidrolisados não concentrado e com fator de concentração cinco foram armazenados em câmara fria a 4°C para posterior utilização.

4.2 Processo de biodestoxificação

4.2.1 Microrganismos

Foram utilizadas linhagens das leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098, isoladas de águas de resíduos industriais contendo compostos fenólicos (HOU-RUI et al., 2008) e mantidas em meio ágar extrato de malte a 4°C . As leveduras foram provenientes da coleção de culturas da *China Center for Type Culture Collection* (CCTCC).

4.2.1.1 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em meio de cultura conforme Tabela 4.1. Para a obtenção do inóculo foram utilizadas soluções concentradas de cada componente, as quais foram preparadas separadamente e esterilizadas em autoclave a 121°C por 20 minutos, com exceção da D-glicose e do extrato de levedura que foram autoclavadas a 110°C por 15 minutos, e da uréia que foi esterilizada por filtrações em membrana *Millipore* 0,22 µm. As soluções foram misturadas assepticamente de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente.

Tabela 4.1 - Composição do meio semi-sintético utilizado para o crescimento do inóculo de *I. occidentalis* CCTCC M 206097 e *I. orientalis* CCTCC M 206098

Componentes	Concentração (g/L)
D-glicose	30,0
Extrato de Levedura	6,0
Uréia	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
K ₂ HPO ₄	4,0
KH ₂ PO ₄	6,0

Fonte: HOU-RUI et al., 2008

Todos os inóculos foram preparados transferindo-se as células proveniente do repique em meio de manutenção para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 200 mL do meio de composição descrito na Tabela 4.1 e incubadas em agitador rotatório a 30°C, sob agitação de 200 rpm, por 24 horas. Em seguida, as células foram separadas por centrifugação (CENTRA CL2 – THERMO IEC) a 3500 x g por 20 minutos e lavadas com água destilada esterilizada, centrifugadas novamente e após descarte do sobrenadante, foram ressuspensas em 20 mL de água destilada esterilizada de forma a se obter uma suspensão celular concentrada. A partir desta suspensão foi calculado o volume necessário para inocular o meio a ser tratado com uma concentração inicial celular de 0,5 g/L.

4.2.2 Preparo do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

O meio utilizado para o ensaio de destoxificação foi preparado com os hidrolisados nas concentrações já mencionadas e suplementados com os nutrientes descritos na Tabela 4.2. Antes de suplementado, o pH dos hidrolisados foi ajustado com pastilhas de NaOH até o valor desejado. Após o ajuste de pH, o hidrolisado foi centrifugado a 3500 x g por 15 minutos para remoção de sólidos e autoclavados. Foram utilizadas soluções concentradas de cada composto, as quais foram preparadas separadamente e esterilizadas em autoclave a 121°C por 20 minutos, com exceção do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e do extrato de levedura que foram autoclavadas a 110°C por 15 minutos, e da uréia que foi filtrada em membrana *Millipore* 0,22 µm. O hidrolisado e os nutrientes foram misturados assepticamente de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente no meio.

Tabela 4.2 - Suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para realização dos ensaios de biodestoxificação

Componentes	Concentração (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
KH ₂ PO ₄	1,0
CaCl ₂	0,1
NaCl	0,1
Uréia	2,0
Extrato de Levedura	6,0

Fonte: HOU-RUI et al., 2008

4.2.3 Avaliação da destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098

4.2.3.1 Avaliação da concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar no processo de destoxificação biológica

A avaliação do tratamento biológico foi realizada por ensaios de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar original e com fator de concentração

cinco empregando-se 0,5 g/L de suspensão celular inicial concentrada das leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis*. Os experimentos foram realizados em triplicata, em incubadora de movimento rotatório utilizando-se frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio, formado por aproximadamente 46,0 mL de hidrolisado e 3,1 mL dos nutrientes descritos na Tabela 4.2, a 30°C, sob agitação de 200 rpm por 72 horas. Nestas mesmas condições foram realizados testes de adsorção de inóculo como controle empregando 0,5 g/L de células não viáveis (autoclavadas).

Para o acompanhamento do processo de biodestoxificação foram realizados ensaios, retirando amostras a cada 24 horas para avaliação da porcentagem de decréscimo na concentração de D-glicose, D-xilose e L-arabinose, ácido acético, furfural, 5-HMF, ácido ferúlico e siringaldeído, assim como crescimento celular e variação de pH.

4.2.3.2 Estudo da influência das variáveis: temperatura, agitação do sistema e pH inicial do hidrolisado na destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

As variáveis selecionadas para realizar o estudo de otimização do processo de destoxificação biológica em agitador de movimento rotatório utilizando as leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis* foram: temperatura (°C), agitação do sistema (rpm) e pH inicial do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Na Tabela 4.3 são apresentados os níveis escolhidos para cada variável.

Tabela 4.3 - Codificação dos níveis para as variáveis avaliadas

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-)	Médio (0)	Superior (+)
X ₁ (temperatura, °C) (FT)	23	30	37
X ₂ (agitação do sistema, rpm) (FA)	100	200	300
X ₃ (pH inicial do hidrolisado) (FpH)	4,0	5,5	7,0

Foi proposto um planejamento fatorial completo 2³ com três repetições no ponto central, conforme apresentado na Tabela 4.4. Como variável de resposta foi considerada

maiores porcentagens de redução na concentração dos inibidores totais (ácido acético, furfural, 5-HMF, siringaldeído e ácido ferúlico). Foi discutido também o consumo dos principais açúcares presentes no hidrolisado.

Tabela 4.4 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 para avaliação da influência das variáveis: temperatura, agitação do sistema e pH inicial do hidrolisado de bagaço de cana

Ensaio	Níveis codificados			Níveis reais		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ (°C)	X ₂ (rpm)	X ₃
01	-	-	-	23	100	4,00
02	+	-	-	37	100	4,00
03	-	+	-	23	300	4,00
04	+	+	-	37	300	4,00
05	-	-	+	23	100	7,00
06	+	-	+	37	100	7,00
07	-	+	+	23	300	7,00
08	+	+	+	37	300	7,00
09	0	0	0	30	200	5,50
10	0	0	0	30	200	5,50
11	0	0	0	30	200	5,50

4.3 Métodos analíticos

Todos os ensaios foram acompanhados por meio do controle analítico de amostras retiradas periodicamente. As observações foram feitas com relação à concentração final e a taxa de consumo de açúcares, ácido acético, furfural, 5-HMF, ácido ferúlico e siringaldeído, crescimento celular e variação de pH.

4.3.1 Determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar

O teor de umidade do bagaço de cana foi determinado por meio da secagem de amostra de bagaço em balança com infravermelho a 100°C (METTLER TOLEDO LJ16 MOISTURE ANALYZER) até peso constante.

4.3.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular no preparo do inóculo foi determinada por turbidimetria em espectrofotômetro (BECKMAN DU 640B) no comprimento de onda de 600 nm, utilizando água como referência e correlacionadas com o peso seco de células (g/L) por meio de curvas de calibração correspondentes para cada levedura estudada. Durante os ensaios de biodestoxificação acompanhou-se o crescimento celular por microscopia óptica em Câmara de Neubauer representados por número de células/mL.

4.3.3 Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado em pH-metro (BEL ENGINEERING W3B).

4.3.4 Determinação dos teores de açúcares e de ácido acético

As concentrações de D-glicose, D-xilose, L-arabinose e ácido acético foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo Waters 410 (Milford, MA, USA) equipado com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), nas seguintes condições: temperatura de 45°C, eluente: ácido sulfúrico 0,005 M; fluxo de 0,6 mL/min; volume de amostra de 20 µL. Após diluição apropriada, as amostras foram previamente filtradas em filtro *Sep Pak C18 Millipore*.

4.3.5 Determinação dos teores de furfural, 5-HMF e compostos fenólicos

As concentrações de furfural, 5-HMF e alguns compostos fenólicos foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Waters 2487/USA equipado com detector UV e coluna ResolveTM C18 Waters 3,9 x 300 nm, nas seguintes condições: temperatura de 25°C; eluente: acetonitrila e água na proporção de 1:8 com 1% de ácido acético; fluxo de 0,9 mL/min; volume da amostra de 20 µL. Após diluição apropriada, as amostras foram filtradas em membrana *Minisart* e alíquotas de 20 µL foram injetadas no cromatógrafo.

4.3.6 Determinação das concentrações dos produtos de decomposição da lignina solúvel em meio ácido

A concentração dos compostos fenólicos totais existentes no hidrolisado hemicelulósico devido à solubilização parcial da lignina, causada pela ação do ácido sulfúrico na etapa de hidrólise, foi determinado pelo método descrito por Rocha (2000).

Uma alíquota do hidrolisado foi alcalinizada até pH 12 pela adição de NaOH 6 M e diluída com água destilada de forma a se obter uma leitura inferior a uma unidade de absorbância. A absorbância desta solução foi determinada usando espectrofotômetro (Beckman DU 640B, Califórnia USA), em comprimento de onda de 280 nm utilizando-se água destilada como referência. A concentração de lignina foi calculada por meio das Equações 4.1 e 4.2, levando-se em consideração a normalização das concentrações em função do fator de diluição empregada.

$$C_{Lig} = [4,187 \times 10^2 (A_{Lig280} - A_{PD280}) - 3,279 \times 10^{-4}] \quad (4.1)$$

$$A_{PD280} = [C_F \epsilon_F + C_{HMF} \epsilon_{HMF}] \quad (4.2)$$

Onde C_{Lig} é a concentração de lignina *Klason* solúvel em meio básico expressa em g/L, A_{Lig280} é a absorbância da solução em 280 nm, C_F e C_{HMF} são as concentrações nas diluições empregadas de furfural e hidroximetilfurfural determinadas por cromatografia

líquida de alta eficiência, e ϵ_F e ϵ_{HMF} são os coeficientes de extinção (L/g.cm) do furfural (146,85) e do 5-HMF (114,00), determinados por espectrofotometria a 280 nm.

4.3.7 Determinação das porcentagens de redução dos compostos tóxicos e dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

As porcentagens de consumo dos compostos inibidores (% RCI) foram calculadas pela relação entre as concentrações destes compostos no início ($CI_{Inicial}$) e no término (CI_{Final}) do processo de biodestoxificação, de acordo com a equação 4.3. Da mesma forma, as porcentagens de consumo do teor de açúcares (% RCA) foram calculadas pela relação entre as concentrações desses açúcares no início ($CA_{Inicial}$) e no término (CA_{Final}) do processo de biodestoxificação (equação 4.4).

$$\% \text{ RCI} = [(CI_{Inicial} - CI_{Final}) / CI_{Inicial}] \times 100 \quad (4.3)$$

$$\% \text{ RCA} = [(CA_{Inicial} - CA_{Final}) / CA_{Inicial}] \times 100 \quad (4.4)$$

4.3.8 Análise estatística

A análise estatística dos experimentos foi realizada utilizando-se os programas Design-Expert versão 5.0 e Statistica versão 6.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar após hidrólise ácida e concentração

De acordo com a Tabela 5.1, as condições de hidrólise empregadas forneceram um hidrolisado rico em D-xilose (12,00 g/L) e com baixa concentração de D-glicose (0,41 g/L), demonstrando uma extração seletiva da fração hemicelulósica do bagaço. Segundo esses resultados, observou-se que a hemicelulose foi susceptível à hidrólise nas condições utilizadas, permanecendo a celulose e a lignina sem considerável degradação. Tal observação está de acordo com o esperado, uma vez que dados da literatura indicam que as condições de hidrólise ácida empregadas mostram-se eficientes para a obtenção de D-xilose a partir da fração hemicelulósica para uso como fonte de carbono em processos fermentativos (SAHA, 2005, CARVALHO et al., 2006).

Tabela 5.1 - Composição parcial (g/L) dos principais componentes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido por hidrólise ácida, em sua forma original (HO) e após processo de concentração (FC 5)

Componentes	Hidrolisado (g/L)	
	HO	FC5
D-xilose	12,00	58,61
D-glicose	0,41	1,84
L-arabinose	0,99	5,06
Ácido Acético	2,00	3,59
Siringaldeído	0,29	0,61
Ácido Ferúlico	$8,3 \times 10^{-2}$	0,37
Furfural	$2,0 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-2}$
5-HMF	$4,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$
Fenóis Totais	3,52	6,95
pH	0,91	0,57

FC = Fator de concentração do hidrolisado

Observa-se na Tabela 5.1 que as concentrações dos açúcares presentes no hidrolisado original aumentaram proporcionalmente ao fator de concentração utilizado. Comportamento semelhante foi evidenciado com relação ao teor de 5-HMF, um dos inibidores normalmente presentes em hidrolisados hemicelulósicos. Em relação às concentrações dos demais compostos tóxicos quantificados, verificou-se um comportamento diferenciado dependendo

do inibidor em questão. Entretanto, a redução na concentração de furfural não foi observada, o que era de se esperar pelo fato de serem compostos facilmente arrastados por vapores; e a concentração de ácido acético foi aumentada de maneira não proporcional ao fator de concentração (SILVA et al., 2004). Para os fenóis totais, assim como para o siringaldeído e o ácido ferúlico, não foi verificado aumento proporcional ao fator de concentração.

Os hidrolisados HO e FC5 apresentaram uma concentração de compostos fenólicos totais iguais a 3,52 g/L e 6,95 g/L, respectivamente (Tabela 5.1). Comparando as concentrações dos compostos fenólicos estudados nos diferentes hidrolisados, foi constatado um aumento de 2,75 vezes na soma desses compostos quando concentrado cinco vezes, ou seja, um aumento não proporcional ao fator de concentração utilizado.

5.2 Processo de destoxificação biológica de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis*

5.2.1 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Para os ensaios com diferentes concentrações de hidrolisado, foram retiradas amostras após ajuste de pH, autoclavagem e suplementação. A composição média desses hidrolisados é apresentada na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Composição parcial (g/L) do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado (HNC) e com fator de concentração cinco (H5C) após ajuste de pH ($5,50 \pm 0,20$), autoclavagem e suplementação

Componentes	Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (g/L)	
	HNC	H5C
D-xilose	11,30	51,50
D-glicose	0,37	1,83
L-arabinose	0,97	4,90
Ácido Acético	1,13	3,30
Siringaldeído	0,27	0,60
Ácido Ferúlico	$8,0 \times 10^{-2}$	0,30
Furfural	$1,8 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-2}$
5-HMF	$4,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$

5.2.2 Efeito da concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar sobre a biodestoxificação

5.2.2.1 Avaliação do crescimento celular das leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis* em diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Ao concentrar o hidrolisado hemicelulósico visando aumentar os teores de açúcares, aumentam-se também a concentração de outros compostos não voláteis considerados inibidores ao crescimento microbiano (SILVA et al., 2004). De acordo com as Figuras 5.1 e 5.2 observou-se que as espécies *I. occidentalis* CCTCC M 206097 e *I. orientalis* CCTCC M 206098, respectivamente, não apresentaram crescimento no número de células no hidrolisado com maiores conteúdos de açúcares e compostos tóxicos (furfural, 5-HMF, compostos fenólicos, ácidos alifáticos) quando comparadas as células cultivadas em hidrolisado com menor concentração destes compostos. É importante ressaltar um aumento de 4,6 vezes na concentração total de açúcares quando concentrado o hidrolisado de bagaço. Este fato pode ter também influenciado o aumento no número de células destas leveduras associado com a elevada presença de outros compostos já que em muitos casos, altas concentrações de substrato podem inibir o crescimento, seja devido ao mecanismo de transporte ou ainda pela elevação da pressão osmótica do meio.

Durante o processo de destoxificação dos hidrolisados não foi possível quantificar o crescimento celular por turbidimetria em espectrofotômetro devido a formação de um precipitado de coloração escura durante estes ensaios, sendo depositado juntamente com as células ao serem centrifugadas, o que interferia na leitura da concentração celular. Diante deste fato, o crescimento celular foi determinado por número de células (n° células/mL).

Com relação à espécie *I. occidentalis* observou-se um aumento de 3,16 vezes (216,13%) no número de células após 72 h de cultivo no HNC em comparação com o H5C (Fig. 5.1). Para a mesma levedura, foi observado um crescimento celular mais acentuado nas primeiras 24 h de ensaio quando destoxificado o HNC (57,57%) e H5C (24,24%).

Figura 5.1 - Curva de crescimento celular (n° células/mL) da levedura *I. occidentalis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado (♦) e com fator de concentração cinco (Δ).

O mesmo comportamento pode ser observado para a levedura *I. orientalis* com um aumento de 3,15 vezes (215,79%) após 72 h de cultivo quando comparados os dois diferentes hidrolisados. No geral, a levedura *I. orientalis* apresentou aumento de aproximadamente 64% no número de células quando comparada com a levedura *I. occidentalis* após 72 h em cultivo no HNC.

Figura 5.2 - Curva de crescimento celular (n° células/mL) da levedura *I. orientalis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado (♦) e com fator de concentração cinco (Δ).

Foram realizados testes de adsorção no inóculo quando destoxificado o H5C a fim de verificar a redução na concentração dos inibidores nos ensaios que não foram observados crescimento celular. Os resultados mostraram que não houve redução na concentração destes inibidores após 24 h de bioensaio com as leveduras avaliadas.

5.2.2.2 Avaliação do pH durante o processo de destoxificação biológica em diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

As variações de pH durante os processos de biodestoxificação dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar com as leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis* apresentaram comportamentos diferentes quando em presença de concentrações mais elevadas de açúcares, ácidos alifáticos, furanos e compostos fenólicos. Observa-se que este comportamento variou de acordo com a concentração do hidrolisado e não pelo microrganismo empregado.

Verifica-se que quando destoxificado o HNC com as leveduras estudadas, houve um aumento de aproximadamente 2,75 unidades no valor de pH nas primeiras 24 h de tratamento (Fig. 5.3 e 5.4). A partir deste instante os valores de pH permaneceram quase que inalterados até o final do processo. Este fato pode estar relacionado à formação de amônia no meio e/ou à excreção de alguns compostos com caráter básicos resultante do metabolismo dos compostos fenólicos (MARTÍNKOVÁ et al., 2009). Nesta mesma condição, observou-se um maior crescimento celular e um maior consumo de açúcares.

Figura 5.3 - Curva de variação de pH durante o processo de destoxificação biológica quando cultivada a levedura *I. occidentalis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado (♦) e com fator de concentração cinco (Δ).

Figura 5.4 - Curva de variação de pH durante o processo de destoxificação biológica quando cultivada a levedura *I. orientalis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado (♦) e com fator de concentração cinco (Δ).

Por outro lado, quando destoxificado o H5C com as linhagens de *I. occidentalis* CCTCC M 206097 e de *I. orientalis* CCTCC M 206098 observou-se uma diminuição de aproximadamente 0,65 unidades no valor de pH nas primeiras 24 h de ensaio. Até o final do processo, esta diferença permaneceu constante para ambos os casos. Este comportamento pode ser justificado pelos novos compostos formados na biotransformação dos furanos a seus respectivos ácidos (HORVÁTH et al., 2003), e/ou pela liberação de algum composto com caráter ácido resultante do metabolismo dos compostos fenólicos (MARTÍNKOVÁ et al., 2009). Nos tratamentos em que houve redução no valor de pH, o crescimento celular das leveduras avaliadas foi constante durante os ensaios de destoxificação. Nestas mesmas condições, observou-se a menor taxa de consumo de pentoses e hexoses presentes no meio destoxificado. Acredita-se que este fato esteja diretamente relacionado às altas concentrações de íons H^+ no meio a ser destoxificado inibindo assim o crescimento das leveduras.

5.2.2.3 Influência do tratamento na composição dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar

A Tabela 5.3 apresenta as porcentagens de redução nas concentrações de açúcares, ácido acético, furfural, 5-HMF, siringaldeído e ácido ferúlico presentes no hidrolisado de

bagaço de cana-de-açúcar original e concentrado após 72 horas do início do ensaio de destoxificação com as duas linhagens de *Issatchenkia* testadas.

Tabela 5.3 - Redução da concentração (%) dos compostos presentes nos HNC e H5C após tratamento de biodestoxificação com as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis*

Compostos	% Redução			
	<i>Issatchenkia occidentalis</i>		<i>Issatchenkia orientalis</i>	
	HNC	H5C	HNC	H5C
D-glicose	100,0	1,1	100,0	100,0
D-xilose	49,6	2,5	11,5	9,7
L-arabinose ¹	100,0	-	100,0	-
Furfural	100,0	100,0	100,0	100,0
5-HMF	100,0	100,0	100,0	85,0
Ácido Ferúlico	100,0	76,7	100,0	16,7
Siringaldeído	92,6	70,0	88,9	16,7
Ácido Acético	100,0	6,1	15,0	0,0

A menor redução na concentração de D-xilose (2,5%) foi observada quando o H5C foi destoxificado com a levedura *I. occidentalis* CCTCC M 206097 após período de 72 h de ensaio. Porém, a maior redução deste açúcar (49,6%) foi obtida com a mesma linhagem em HNC. Observa-se também, que o consumo de D-xilose pelas leveduras avaliadas foi menor quando este açúcar esteve presente em maiores concentrações no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Como a concentração desta pentose é um dos principais fatores que influenciam na produtividade de xilitol e/ou etanol em diferentes processos fermentativos, perdas significativas deste açúcar comprometem a eficiência do bioprocesso.

Nas Figuras 5.5 e 5.6 foi apresentado o perfil do consumo de D-xilose pelas leveduras avaliadas quando empregadas como agentes destoxificantes de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações. Observou-se uma diminuição de aproximadamente 30% na concentração deste açúcar já nas primeiras 24 h de ensaio quando empregada a levedura *I. occidentalis* para destoxificar o HNC. Neste mesmo intervalo de tempo e condições de hidrolisado, o consumo de D-xilose pela levedura *I. orientalis* foi de 5,13% (Fig. 5.5). Porém, o perfil do consumo desta pentose em H5C apresentou-se de forma diferente. Pela Figura 5.6 observou-se que em 72 h de biodestoxificação do H5C o consumo de D-xilose pela espécie *I. occidentalis* foi de apenas 2,50%. A mesma porcentagem de redução foi observada nas primeiras 24 h de bioprocessamento empregando-se a levedura *I. orientalis* no

¹ Aumento na concentração deste açúcar quando destoxificado o H5C durante 72 h de ensaio.

mesmo tipo de hidrolisado. Ao final de 72 h de ensaio em H5C o consumo de D-xilose foi de 9,7% quando empregada a cepa de *I. orientalis*. Pivetta, Arruda e Felipe (2008) observaram uma remoção de 23,9% de D-xilose quando trataram o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com os métodos de variação de pH seguido de carvão ativo. Em algumas condições empregadas neste trabalho a perda deste açúcar foi de apenas 1,0 g/L.

Figura 5.5 - Consumo de D-xilose pelas leveduras *I. occidentalis* (♦) e *I. orientalis* (Δ) quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado.

Figura 5.6 - Consumo de D-xilose pelas leveduras *I. occidentalis* (♦) e *I. orientalis* (Δ) quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

Quando analisado o consumo de D-glicose, observou após 24 h de ensaio uma redução total deste açúcar ao destoxificar o HNC com ambas as espécies avaliadas, como apresentado na Figura 5.7.

Figura 5.7 - Consumo de D-glicose pelas leveduras *I. occidentalis* (◆) e *I. orientalis* (Δ) quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado.

A Figura 5.8 apresenta o consumo de D-glicose pelas leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis* quando avaliadas seu comportamento em H5C. Um consumo total é observado após 48 h de processo quando empregada a espécie *I. orientalis*. Porém, o consumo deste açúcar pela espécie *I. occidentalis* foi de apenas 1,1% durante todo o experimento.

Figura 5.8 - Consumo de D-glicose pelas leveduras *I. occidentalis* (◆) e *I. orientalis* (Δ) quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

Ao analisar o consumo de L-arabinose presente no HNC, verificou-se uma redução em sua totalidade independente da linhagem utilizada, no entanto em diferentes tempos de ensaios. A Figura 5.9 mostrou um aumento de aproximadamente 30% na concentração deste açúcar após 24 h de bioprocessamento quando tratado este hidrolisado com a levedura *I. orientalis*. Neste mesmo instante, a levedura *I. occidentalis* consumiu em sua totalidade o açúcar em

questão. A redução total deste açúcar quando destoxificado o HNC com a espécie *I. orientalis* foi verificada após 48 h de tratamento.

Figura 5.9 - Consumo de L-arabinose pelas leveduras *I. occidentalis* (♦) e *I. orientalis* (Δ) quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado.

Figura 5.10 - Consumo de L-arabinose pelas leveduras *I. occidentalis* (♦) e *I. orientalis* (Δ) quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

Por outro lado, quando destoxificado o H5C com ambas as espécies avaliadas foi verificado que a concentração de L-arabinose oscilou durante todo o experimento. Este comportamento pode ser explicado pela formação de novos compostos, como por exemplo, o arabitól, que possivelmente estejam sendo excretados durante o metabolismo deste e de outros açúcares, interferindo assim em sua quantificação. Ao final de 72 h de biodestoxificação um aumento de 11,83% e uma redução de apenas 3,7% foi verificado quando tratado o H5C com *I. orientalis* e *I. occidentalis* respectivamente.

Em relação ao ácido acético, observou uma redução total na concentração deste composto apenas ao destoxificar o HNC com a linhagem de *I. occidentalis* após 48 h de ensaio. Contudo, uma diminuição na concentração do ácido de aproximadamente 55% foi verificada com apenas 24 h de processo utilizando a mesma levedura. Quando analisado o comportamento da espécie *I. orientalis* em HNC, observou-se uma redução na concentração do composto de apenas 2,65% nas primeiras 24 h de experimento, chegando a 11,5% ao final do processo (Fig. 5.11).

Figura 5.11 - Redução na concentração de ácido acético quando cultivadas as leveduras *I. occidentalis* (◆) e *I. orientalis* (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado.

A Figura 5.12 apresenta o perfil da redução na concentração de ácido acético presente no H5C durante o biotratamento com as leveduras estudadas. A redução deste ácido alifático neste hidrolisado ao final do processo foi de apenas 5,45% quando utilizado a levedura *I. occidentalis*, não observando o consumo deste composto quando utilizado a outra espécie. Também a Figura 5.12 mostra que a concentração do ácido acético no hidrolisado concentrado não ultrapassou a 3,3 g/L em ambos os hidrolisados ao final de 72 h de ensaio. Felipe et al. (1995), estudaram o efeito da concentração do ácido acético nas fermentações de D-xilose para produção de xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 em meio semi-sintético, e constataram que o aumento da concentração do ácido até 1,0 g/L levou a um favorecimento no rendimento e produtividade de xilitol quando utilizada esta levedura. Estes mesmos autores observaram também que a levedura foi capaz de assimilar o ácido acético juntamente com os açúcares, sendo completamente consumido em concentrações menores que 3,0 g/L.

Figura 5.12 - Redução na concentração de ácido acético quando cultivadas as leveduras *I. occidentalis* (♦) e *I. orientalis* (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

Verificou redução total na concentração de 5-HMF apenas ao destoxificar o HNC com a espécie *I. orientalis* após 48 h de ensaio (Fig. 5.13). Porém, ao concentrar o hidrolisado de bagaço, a redução na concentração deste furano nas primeiras 24 h foi de 80%, redução superior quando destoxificado o HNC neste mesmo tempo de ensaio (35%). Quando analisada a destoxificação empregando a levedura *I. occidentalis*, observou uma diminuição de 100% na concentração de 5-HMF após 24 h e 48 h, quando destoxificado o HNC e o H5C respectivamente. Verifica-se na Figura 5.14 que durante todo o bioprocessamento em H5C a perda deste furano foi de 85%, reduzindo sua concentração no meio a 0,003 g/L ao empregar a espécie *I. orientalis*.

Figura 5.13 - Redução na concentração de 5-hidroximetilfurfural quando cultivadas as leveduras *I. occidentalis* (♦) e *I. orientalis* (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado.

Figura 5.14 - Redução na concentração de 5-hidroximetilfurfural quando cultivadas as leveduras *I. occidentalis* (♦) e *I. orientalis* (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

No caso do furfural, os resultados apresentados nas Figuras 5.15 e 5.16 mostraram uma redução total na concentração do composto quando destoxificado o HNC e H5C para ambas as leveduras avaliadas. Em HNC, a redução total na concentração de furfural foi observada em 24 h e 48 h de bioprocessamento quando destoxificado com as espécies *I. occidentalis* e *I. orientalis*, respectivamente. Contudo, quando analisado a concentração deste furano ao destoxificar o H5C, o perfil de redução na concentração deste composto apresentou-se semelhante para ambas as leveduras avaliadas durante todo o processo. A redução de furfural foi de aproximadamente 62% após 24 h de ensaio, atingindo sua totalidade em 48 h de experimento (Fig. 5.16).

Figura 5.15 - Redução na concentração de furfural quando cultivadas as leveduras *I. occidentalis* (♦) e *I. orientalis* (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado.

Figura 5.16 - Redução na concentração de furfural quando cultivadas as leveduras *I. occidentalis* (◆) e *I. orientalis* (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

Alguns métodos físico-químicos de destoxificação de hidrolisado hemicelulósico apresentaram resultados menos favoráveis na remoção desses compostos quando comparado ao método empregado neste trabalho. De acordo com Carvalho et al. (2004), ao destoxificarem o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com 4 diferentes tipos de resinas (aniônica A-103 S, aniônica A-860 S, Applexion catiônica e Applexion aniônica), estas promoveram uma remoção de 82,1% de furfural e 66,5% de 5-HMF. Em trabalho semelhante utilizando resinas aniônicas em pH 10, Larsson et al. (1999) ao destoxificarem o hidrolisado hemicelulósico de madeira, observaram uma queda de 73% de furfural e 70% de 5-HMF, resultados inferiores ao encontrado neste trabalho, com resquícios de 0,27 e 1,77 g/L de furfural e 5-HMF respectivamente.

Um exemplo de tratamento de destoxificação de hidrolisado empregando extração com solvente orgânico foi avaliado por Frazer e McCahey (1989). Estes autores ao destoxificarem hidrolisado de madeira utilizando apenas acetato de etila como agente extrator ou hexano em combinação com hidróxido de cálcio, mostraram que os estes tratamentos reduziram o nível de furfural em 83%, quando iniciados com 0,4 mg/mL e 0,2 mg/mL de acetato de etila e hexano, respectivamente. Nessas mesmas condições observou-se uma queda de aproximadamente 25% na concentração inicial de açúcares em ambos os casos. Quando comparado este método de extração por solvente com a destoxificação empregando *I. occidentalis* e *I. orientalis*, o método apresentado no presente trabalho mostrou-se mais eficiente quanto a remoção destes furanos.

No presente trabalho, as discussões referentes aos compostos fenólicos foram baseadas nas remoções de ácido ferúlico e siringaldeído, alguns dos compostos encontrados em maiores concentrações em hidrolisados hemicelulósicos (DELGENES et al., 1996; LEE et al., 1999). A soma das concentrações desses dois compostos fenólicos, neste trabalho, foi de 0,35 e 0,90 g/L nos HNC e H5C, respectivamente, ou seja, foram analisados aproximadamente 10% da concentração dos fenóis totais presentes no HNC e de 13% do H5C.

De acordo com a Figura 5.17, observa-se que quando utilizada a levedura *I. orientalis* para destoxificar o HNC, a redução na concentração de ácido ferúlico atingiu sua totalidade com apenas 24 h de ensaio. Este mesmo resultado foi conseguido somente após 72 h de experimento quando empregada a cepa de *I. occidentalis*. Porém, a partir de 24 h de bioprocessamento empregando esta espécie, observou-se uma diminuição de 62,5% na concentração deste fenol. A redução na concentração do segundo fenol avaliado apresentou perfil diferente quando empregada as leveduras avaliadas como agentes destoxificantes do HNC. Com 24 h de processo, observou-se uma redução na concentração de siringaldeído de 40,74 e 55,55% ao empregar *I. occidentalis* e *I. orientalis*, respectivamente (Fig. 5.18). Contudo, ao final de 72 h de bioprocessamento a diminuição na concentração deste composto é mais acentuada quando destoxificado com a levedura *I. occidentalis* (92,6%). A Figura 5.18 apresenta também que neste mesmo instante a redução na concentração de siringaldeído em HNC empregando a levedura *I. orientalis* foi de 88,9%.

Figura 5.17 - Redução na concentração de ácido ferúlico quando cultivadas as leveduras *I. occidentalis* (♦) e *I. orientalis* (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado.

Figura 5.18 - Redução na concentração de siringaldeído quando cultivadas as leveduras *I. occidentalis* (◆) e *I. orientalis* (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado.

Quando utilizado o H5C, a levedura *I. occidentalis* apresentou melhores resultados em relação a outra espécie avaliada, com uma redução de 76,7 e 70,0% nas concentrações de ácido ferúlico e siringaldeído respectivamente, ao final de 72 h de processo. Nestas mesmas condições de processo a espécie *I. orientalis* consumiu apenas 16,7% para ambos os compostos fenólicos (Fig. 5.19 e 5.20)

Figura 5.19 - Redução na concentração de ácido ferúlico quando cultivadas as leveduras *I. occidentalis* (◆) e *I. orientalis* (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

As Figuras 5.19 e 5.20 apresentam a redução na concentração destes compostos fenólicos quando tratados H5C com as espécies avaliadas. Observou-se uma redução de 73,33 e 66,67% na concentração de ácido ferúlico e siringaldeído respectivamente, quando empregada a levedura *I. occidentalis* nas primeiras 24 h de biodestoxificação. Neste instante

nos ensaios utilizando a espécie *I. orientalis* a redução na concentração de siringaldeído foi de apenas 5%, não observando redução na concentração de ácido ferúlico.

Figura 5.20 - Redução na concentração de siringaldeído quando cultivadas as leveduras *I. occidentalis* (◆) e *I. orientalis* (Δ) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

Quando destoxificado o hidrolisado hemicelulósico de milho, Nichols et al. (2008) observaram uma redução de 97 e 84% nas concentrações de ácido ferúlico e siringaldeído, respectivamente. Porém, as concentrações iniciais desses compostos foram menores que aquelas encontradas no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho. A concentração inicial desses compostos no trabalho de Nichols e colaboradores foram de 15,0 ppm e 3,0 ppm de ácido ferúlico e siringaldeído, respectivamente. Em contrapartida, o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar concentrado (H5C) destoxificado no presente trabalho, apresentou uma concentração inicial de 0,3 e 0,6 g/L de ácido ferúlico e siringaldeído, respectivamente.

As Figuras 5.21 e 5.22 apresentam as porcentagens de redução nas concentrações dos açúcares e inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar ao empregar as leveduras estudadas após 24 h de bioprocessamento. Verifica-se nestas Figuras que a redução na concentração de açúcares foi maior ao destoxificar o HNC, independentemente da levedura empregada. Entretanto, uma diferença na redução da concentração de furanos e fenólicos foi observada dependendo do microrganismo empregado como agente destoxificante.

Na Figura 5.21 observou-se que ao destoxificar o H5C com a espécie *I. occidentalis*, a redução na concentração dos compostos fenólicos avaliados foi maior que ao destoxificar o HNC. Em contrapartida, a redução de 5-HMF e furfural quando em maiores concentrações (H5C) foi menor, porém, com valores superiores a 70% de redução.

Figura 5.21 - Porcentagem de redução na concentração dos açúcares e dos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana original (HNC) e com fator de concentração cinco (H5C) após 24 h de destoxificação empregando levedura *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097.

Ao avaliar a destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com a outra espécie estudada, um comportamento diferente em relação ao consumo de furanos e fenólicos foi observado (Fig. 5.22). Nos ensaios com a levedura *I. orientalis* verificou-se uma maior redução na concentração dos furanos quando cultivada esta espécie em H5C. Apesar da redução na concentração dos furanos ser maior em H5C, seus valores ao final de 24 h de bioprocessamento foi superior quando destoxificado com a espécie *I. occidentalis*. Ao avaliar a remoção de ácido ferúlico e de siringaldeído, a levedura *I. orientalis* não demonstrou eficiência na remoção destes compostos quando cultivadas em H5C. Após 24 h de ensaio, foi observado uma redução de apenas 5% na concentração de siringaldeído, não verificando diminuição na concentração de ácido ferúlico.

Figura 5.22 - Porcentagem de redução na concentração dos açúcares e dos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana original (HNC) e com fator de concentração cinco (H5C) após 24 h de destoxificação empregando a levedura *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098.

Os resultados apresentados no presente trabalho, sugerem que as linhagens estudadas apresentam capacidade de reduzir a concentração dos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com apenas 24 h de biodestoxificação. Uma outra vantagem observada ao longo do estudo ao empregar microrganismos como agentes destoxificantes destes hidrolisados é o fato de ser uma metodologia sem perda considerável de volume. Neste trabalho não foi observado perda maior que 5% de volume ao tratar os HNC e H5C com as leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098.

Diante desses resultados foi escolhido o hidrolisado com fator de concentração cinco (H5C) para os posteriores ensaios de biodestoxificação com o objetivo de avaliar a influência do pH inicial do hidrolisado, da temperatura e da agitação sobre a redução na concentração dos compostos tóxicos presentes neste hidrolisado. Outro fator importante na escolha desta concentração de hidrolisado foi o baixo consumo de açúcares pelas espécies utilizadas como agentes destoxificantes.

5.3 Análise estatística das variáveis estudadas no processo de biodestoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

5.3.1 Caracterização parcial dos hidrolisados hemicelulósicos concentrados submetidos à biodestoxificação

A destoxificação biológica visando maior remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar foi realizada de acordo com um planejamento experimental completo 2^3 com 3 repetições no ponto central (Tabela 5.4) para as leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098. O pH inicial do hidrolisado ($0,94 \pm 0,04$), por ser uma das variáveis independentes estudadas juntamente com a agitação e temperatura de cultivo, precisou ser elevado antes do processo de biodestoxificação. Nesta etapa de elevação do pH do hidrolisado pode ocorrer mudanças com relação a sua composição parcial. A Tabela 5.4 mostra a caracterização parcial dos hidrolisados após ajuste de seu pH inicial de acordo com o planejamento estatístico, autoclavagem e suplementação.

Tabela 5.4 - Composição parcial (g/L) do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana concentrado após ajuste de pH, autoclavagem e suplementação²

Componentes	Concentração (g/L)				
	pH 4,0	pH 5,5			pH 7,0
		Ponto Central (1)	Ponto Central (2)	Ponto Central (3)	
D-xilose	51,71	51,52	52,48	52,43	49,53
D-glicose	1,81	2,27	2,30	2,31	1,72
Total	53,52	53,79	54,78	54,74	51,25
Ácido Acético	2,74	3,31	2,88	2,84	3,42
5-HMF	0,013	0,016	0,020	0,018	0,018
Furfural	0,012	0,016	0,016	0,016	0,028
Siringaldeído	0,703	0,637	0,600	0,620	0,530
Ácido Ferúlico	0,363	0,345	0,309	0,332	0,262
Total	3,94	4,32	3,82	3,82	4,26

² (NH₄)₂SO₄ – 5,0 g/L; MgSO₄·7H₂O – 0,2 g/L; KH₂PO₄ – 1,0 g/L; CaCl₂ – 0,1 g/L; NaCl – 0,1 g/L; Uréia – 2,0 g/L; Extrato de levedura – 6,0 g/L.

Verifica-se na Tabela 5.4 que ao ajustar o hidrolisado com diferentes valores de pH, as concentrações de açúcares e inibidores totais não sofreram alterações maiores que 15% para os inibidores e 10% para os açúcares totais.

O hidrolisado concentrado foi submetido ao tratamento biológico com as linhagens de *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 objetivando avaliar a influência dos fatores pH inicial do hidrolisado, agitação do sistema e temperatura, sobre a remoção do total de açúcares (D-xilose e D-glicose) e do total de compostos inibidores (ácido acético, 5-HMF, furfural, siringaldeído e ácido ferúlico) presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

5.3.2 Influência das variáveis sobre a redução nas concentrações de açúcares e inibidores totais presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Os ensaios de biodestoxificação empregando as leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis* foram realizados de acordo com o delineamento experimental proposto no item 4.2.3.2. A composição parcial dos hidrolisados e as porcentagens de redução das concentrações de açúcares e inibidores totais após 24 h de biodestoxificação em diferentes condições experimentais estão apresentadas na Tabela 5.5 e nas Figuras 5.23 e 5.24, respectivamente.

Tabela 5.5 - Concentração total (g/L) de açúcares e inibidores após 24 h de tratamento biológico com as leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098

Ensaio	FT	FA	FpH	<i>Issatchenkia occidentalis</i> Concentração final (g/L)		<i>Issatchenkia orientalis</i> Concentração final (g/L)	
				Açúcares	Inibidores	Açúcares	Inibidores
01	-1	-1	-1	48,01	2,91	49,25	2,92
02	+1	-1	-1	49,85	3,44	50,64	3,24
03	-1	+1	-1	37,63	3,05	44,93	3,04
04	+1	+1	-1	45,97	3,49	46,42	3,41
05	-1	-1	+1	50,74	3,60	46,96	3,66
06	+1	-1	+1	49,35	3,51	45,63	3,54
07	-1	+1	+1	34,52	3,71	33,09	4,16
08	+1	+1	+1	35,32	3,44	30,42	4,15
09	0	0	0	52,98	3,60	46,44	3,90
10	0	0	0	54,39	3,15	49,42	3,41
11	0	0	0	53,64	3,09	48,86	3,41

FT = Fator temperatura; FA = Fator agitação; FpH = Fator pH inicial do hidrolisado.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.5 e nas Figuras 5.23 e 5.24, verificou-se que a remoção de inibidores e açúcares no hidrolisado foram influenciadas diferentemente de acordo com a levedura e condição de cultivo (pH, agitação e Temperatura).

A menor redução na concentração de açúcares (0,72%) no hidrolisado H5C ocorreu com a espécie *I. occidentalis* utilizando as níveis das variáveis independentes no ponto central, ou seja, pH de 5,5, 200 rpm e 30°C (ensaio 10). As repetições no ponto central, correspondentes aos ensaios 09 e 11, apresentaram redução de açúcares de 1,50 e 2,00%, respectivamente. No entanto, para esta mesma levedura observou-se maior remoção de açúcares (32,64%) (Fig. 5.23) mantendo-se a temperatura em seu nível inferior (-1), ou seja, 23°C e a agitação e pH em seus níveis superiores (+1), 300 rpm e pH 7,0, respectivamente (ensaio 7).

No geral observou-se que o perfil de consumo dos açúcares entre as leveduras foram diferentes (Figura 5.23). No caso da levedura *I. orientalis*, a menor redução de açúcares (5,38%) ocorreu com as variáveis independentes agitação e pH em seus níveis inferiores, 100 rpm e pH 4,0, respectivamente e com a temperatura no seu nível superior (+1) correspondendo a 37°C (ensaio 02). No entanto, a condição em que se obteve maior remoção de açúcares (40,64%) no hidrolisado durante o tratamento biológico com a *I. orientalis* diferiu da *I. occidentalis* somente com a elevação da temperatura de 23 para 37°C, mantendo-se a agitação em 300 rpm e pH em 7,0 (ensaio 8). Observou-se também uma pequena variação de 4% entre os resultados de remoção de açúcares entre os pontos centrais para tratamento biológico empregando a levedura *I. orientalis*, o que de certa forma afirma a estabilidade desta levedura deste processo.

Figura 5.23 - Porcentagem de redução na concentração de açúcares totais (D-glicose e D-xilose) quando destoxificado o H5C com as leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis* nos diferentes ensaios do planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central.

Com relação a remoção de inibidores no hidrolisado (Figura 5.24) observou-se os máximos valores de 26,14 e 25,89% para as espécies *I. occidentalis* e *I. orientalis*, respectivamente, nos ensaios conduzidos sob as mesmas condições experimentais, ou seja, empregando todas as variáveis independentes em seus níveis inferiores (ensaio 1).

Figura 5.24 - Porcentagem de redução na concentração do total de inibidores quando destoxificado o H5C com as leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis* nos diferentes ensaios do planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central.

Os menores valores para remoção de inibidores foram de 11,42 e 2,34% para as leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis*, nos ensaios 4 (37°C/300 rpm/pH 4,0) e 7 (23°C/300 rpm/pH 7,0), respectivamente. Deve-se salientar que independentemente da condição experimental empregada a levedura *I. occidentalis* apresentou remoção de inibidores maiores que 10%. Este fato não foi observado para a levedura *I. orientalis*.

No geral, os menores valores de remoção de açúcares foram obtidos nos ensaios 01 e 02, independentemente da levedura empregada no tratamento de destoxificação (Figura 5.23). Para estes ensaios, observou-se redução de açúcares de 10,29 e 6,86% para *I. occidentalis* e 7,98 e 5,38%, para *I. orientalis*. No entanto, os ensaios 01 e 02 podem ser comparados com os ensaios 03 e 04, diferindo somente com a elevação do nível de agitação de 100 para 300 rpm, o que de certa forma favoreceu a remoção de açúcares de 29,68 e 14,10% com a levedura *I. occidentalis* e 16,05 e 13,26% com a linhagem *I. orientalis*, respectivamente. A temperatura em seu nível inferior (23°C) favoreceu a diminuição na concentração de açúcares, fato observado quando comparados os ensaios 01 e 02 e os ensaios 03 e 04, independente da espécie utilizada.

O mesmo comportamento pode ser observado, nos ensaios com a levedura *I. occidentalis*, com relação a redução dos inibidores quando realizados os experimentos com o pH e a temperatura em seus níveis inferiores. Os ensaios 01 e 03 submetidos a menor temperatura, favoreceu a diminuição na concentração dos inibidores, com reduções superiores a 20%. O fator agitação pareceu não apresentar significância. Comportamento diferente foi observado quando destoxificado o H5C com a espécie *I. orientalis*. Com relação a redução na concentração dos inibidores, quando empregada o fator pH em seu nível inferior, observou-se que a temperatura apresentou maior influência na redução desses compostos que o fator agitação. Nos ensaios 01 e 03 onde empregou-se uma temperatura de 23°C (nível inferior) a redução na concentração dos inibidores foi de 25,89 e 22,84% respectivamente. Ao passar este fator para seu nível superior, observou-se uma diminuição na porcentagem de redução destes compostos, como verificado nos ensaios 02 e 04 (17,76 e 13,45% respectivamente). Nestas condições, o fator temperatura em seu nível inferior favoreceu a diminuição na concentração dos inibidores e o fator agitação não apresentou significância.

Quando analisado os ensaios 05, 06, 07 e 08 destoxificados com a espécie *I. occidentalis*, em que o fator pH estava presente em seu nível superior, observou-se que o fator temperatura não foi significante quanto a redução dos açúcares. Porém, a interação entres os

fatores pH e agitação mostrou-se importante. Nos experimentos conduzidos à 300 rpm (ensaios 07 e 08), à redução de açúcares foi de aproximadamente 32%. Quando destoxificado o hidrolisado à 100 rpm a redução foi de apenas 0,99 e 3,71% (ensaios 05 e 06, respectivamente). Nesta condição de pH (7,0), o fator temperatura em seu nível superior (37°C) favoreceu a redução de inibidores, porém, seus valores não ultrapassaram os 20%. Verificou-se também pela Figura 5.24, que ao serem analisados a redução na concentração do total dos inibidores quantificados, o ensaio que apresentou melhor resultado foi aquele em que todos os fatores estavam presentes nos níveis inferiores; com uma remoção de 26,14% do total destes inibidores. Uma redução de apenas 12,91% foi observada quando empregada as condições do ensaio 07 (23°C/300 rpm/pH 7,0).

Nestes mesmos ensaios, porém, empregando como agente destoxificante a levedura *I. orientalis*, observou-se que a temperatura não foi significativa quanto a redução dos açúcares. Porém, a interação entre os fatores pH e agitação mostrou-se importante. Nos experimentos conduzidos à 300 rpm, à redução de açúcares foi de 35,43 e 40,64% para os ensaios 07 e 08, respectivamente. Contudo, quando destoxificado o hidrolisado à 100 rpm a redução foi de aproximadamente 9% (ensaios 05 e 06). O mesmo fato pode ser observado em relação a redução na concentração dos inibidores. Quando realizado os experimentos sob uma agitação de 100 rpm, a redução destes inibidores foi maior comparado aos ensaios em que empregou-se o mesmo fator em seu nível superior (300 rpm). Nesta condição de pH (7,0) e com uma temperatura de 37°C, a redução na concentração de inibidores foram próximos aos 15%. A seguir, os dados referentes a remoção de inibidores no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 serão analisados estatisticamente.

5.3.3 Determinação dos modelos propostos para a remoção de inibidores por *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098

A Tabela 5.6 mostra a matriz de planejamento fatorial 2^3 com 3 repetições no ponto central. Encontram-se os fatores das variáveis quantitativas, temperatura (X_1), agitação (X_2) e pH (X_3) contendo as condições experimentais na forma de valores reais e codificados tendo a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis* como fator resposta.

Tabela 5.6 - Matriz para a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis*, apresentando os níveis codificados e naturais de um planejamento fatorial 2^3 completo com 3 repetições no ponto central

Ensaio	FT (°C)	FA (rpm)	FpH	Variáveis Codificadas			Remoção de Inibidores	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃	<i>I. occidentalis</i> (%)	<i>I. orientalis</i> (%)
01	23	100	4,0	-1	-1	-1	26,14	25,89
02	37	100	4,0	+1	-1	-1	12,69	17,76
03	23	300	4,0	-1	+1	-1	22,59	22,84
04	37	300	4,0	+1	+1	-1	11,42	13,45
05	23	100	7,0	-1	-1	+1	15,49	14,08
06	37	100	7,0	+1	-1	+1	17,60	16,90
07	23	300	7,0	-1	+1	+1	12,91	2,34
08	37	300	7,0	+1	+1	+1	19,25	2,58
09	30	200	5,5	0	0	0	16,67	9,93
10	30	200	5,5	0	0	0	17,54	10,73
11	30	200	5,5	0	0	0	19,11	10,96

FT = Fator temperatura (°C); FA = Fator agitação (rpm); FpH = Fator pH inicial do hidrolisado.

O diagrama de Pareto foi usado para examinar o efeito das variáveis e suas interações sobre a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *I. occidentalis* (Fig. 5.25A) e *I. orientalis* (Fig. 5.25B) de acordo com planejamento fatorial 2^3 completo com 3 repetições no ponto central, permitindo a identificação dos efeitos de interação de acordo com sua importância. Em conjunto com o diagrama de Pareto, a análise de variância (ANOVA) foi usada para determinar a significância estatística de cada uma das variáveis e suas interações sobre a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *I. occidentalis* (Tabela 5.7) e *I. orientalis* (Tabela 5.8). A interpretação dos resultados foi simplificada com a remoção das variáveis e suas interações não significativas no nível de 90% de confiança ($p \leq 0,1$). O diagrama de Pareto apresenta os valores absolutos do efeito dos fatores que são importantes no delineamento de experimentos para otimização. Ele apresenta uma linha de referência para indicar que os fatores que se estendem além desta linha são potencialmente importantes. No caso, da levedura *I. occidentalis* (Fig. 5.25A) somente o fator principal agitação juntamente com a interação agitação e pH não apresentaram significância a um nível de 90% de confiança. Com este mesmo nível de significância, para a levedura *I. orientalis* (Figura 5.25B) deve-se eliminar o fator principal temperatura e sua interação com o fator agitação.

Figura 5.25 - Diagrama de Pareto com os efeitos estimados do *screening* das variáveis significativas no nível de 90% de confiança para remoção de inibidores do hidrolisado de bagaço de cana pelas leveduras *I. occidentalis* (A) e *I. orientalis* (B) de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 com 3 repetições no ponto central.

A análise dos resíduos dos modelos propostos para a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar tanto pela levedura *I. occidentalis* como para a *I. orientalis*, na qual se verifica a disposição dos pontos preditos pela curva com relação à média e seus respectivos resíduos, foram dispostos de maneira aleatória, não sugerindo um padrão geométrico que possa indicar uma anormalidade na distribuição dos resíduos, assim a curva representa os pontos de maneira satisfatória, pois os erros seguem uma distribuição normal (dados não apresentados). A partir desta constatação, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis*, respectivamente representadas na Tabela 5.7 e 5.8, que utiliza o método do ajuste do mínimo quadrado, conhecido também como análise de regressão dos fatores incluindo as médias quadráticas e as interações de 2ª ordem para testar se a equação de regressão era estatisticamente significativa. A importância dos efeitos pode ser determinada pela ANOVA, os efeitos e sua importância podem ser visualizados nos gráficos padronizados de Pareto.

Tabela 5.7 - Análise de variância (ANOVA) para a remoção total de inibidores por *I. occidentalis* seguindo com planejamento fatorial 2^3 completo com 3 repetições no ponto central

Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de P
Temperatura [X_1]	32,6836	1	32,6836	31,84	0,0045
Agitação [X_2]	4,13281	1	4,13281	4,03	0,1153*
pH [X_3]	7,20101	1	7,20101	7,02	0,0571
$X_1 X_2$	5,29751	1	5,29751	5,16	0,0856
$X_1 X_3$	136,703	1	136,703	133,18	0,0003
$X_2 X_3$	1,89151	1	1,89151	1,84	0,2462*
Erro Total	4,10592	4	1,02648	-	-
Total	192,015	10	-	-	-

$R^2 = 0,9786$, R^2 (ajustado) = 0,9465

*Fatores e interações não significativas

Tabela 5.8 - Análise de variância (ANOVA) para a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por *I. orientalis* seguindo com planejamento fatorial 2^3 completo com 3 repetições no ponto central

Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de P
Temperatura [X_1]	19,4065	1	19,4065	2,56	0,1850*
Agitação [X_2]	123,402	1	123,402	16,26	0,0157
pH [X_3]	220,92	1	220,92	29,12	0,0057
$X_1 X_2$	4,2632	1	4,2632	0,56	0,4952*
$X_1 X_3$	43,1521	1	43,1521	5,69	0,0756
$X_2 X_3$	53,5612	1	53,5612	7,06	0,0566
Erro Total	30,3503	4	7,58756	-	-
Total	495,055	10	-	-	-

$R^2 = 0,9387$, R^2 (ajustado) = 0,8467

*Fatores e interações não significativas

Nas Tabelas 5.7 e 5.8, encontram-se a análise de variância (ANOVA) para a remoção total de inibidores por *I. occidentalis* e *I. orientalis*, dos dados referentes aos resultados apresentados na Tabela 5.6. Através de uma análise generalizada pode-se fazer uma triagem inicial dos fatores e interações de 2ª ordem que foram significativos a um nível de 90 e 95% de confiança. A partir desta análise foram descartadas as interações agitação x pH para os resultados com a levedura *I. occidentalis* e temperatura x agitação para a levedura *I. orientalis*. Deve-se observar também que os efeitos principais agitação e temperatura para a remoção de inibidores pelas leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis*, respectivamente não foram estatisticamente significativas a nível de 90% de confiança, porém permaneceram no modelo por hierarquia, ou seja, apresentaram interações significativas.

Nas Tabelas 5.9 e 5.10 encontram-se a análise de variância (ANOVA) após triagem dos fatores e interações não significativas no nível de 90 e 95% de confiança para remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *I. occidentalis* e *I. orientalis*, respectivamente, indicando que o F estimado foi maior que o F tabelado, assim, tem-se evidência da existência de uma relação quadrática entre os fatores e interações (variáveis independentes) com a variável resposta, indicando assim que todos os fatores foram estatisticamente significativos, com bom intervalo de confiança.

Tabela 5.9 - Análise de variância (ANOVA) após triagem dos fatores e interações não significativos a nível de 90 e 95% de confiança para remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela espécie *I. occidentalis* seguindo com planejamento fatorial 2^3 completo com 3 repetições no ponto central

Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de P
Temperatura [X_1]	32,6836	1	32,6836	27,25	0,0034
Agitação [X_2]	4,13281	1	4,13281	3,45	0,1226
pH [X_3]	7,20101	1	7,20101	6,00	0,0579
$X_1 X_2$	5,29751	1	5,29751	4,42	0,0896
$X_1 X_3$	136,703	1	136,703	113,97	0,0001
Erro Total	5,99743	5	1,19949	-	-
Total	192,015	10	-	-	-

$R^2 = 0,9688$, R^2 (ajustado) = 0,9375

Tabela 5.10 - Análise de variância (ANOVA) após triagem dos fatores e interações não significativos a nível de 90 e 95% de confiança para remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela espécie *I. orientalis* seguindo com planejamento fatorial 2^3 completo com 3 repetições no ponto central

Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de P
Temperatura [X_1]	19,4065	1	19,4065	2,80	0,1549
Agitação [X_2]	123,402	1	123,402	17,83	0,0083
pH [X_3]	220,92	1	220,92	31,91	0,0024
$X_1 X_3$	43,1521	1	43,1521	6,23	0,0547
$X_2 X_3$	53,5612	1	53,5612	7,74	0,0388
Erro Total	34,6135	5	6,92269	-	-
Total	495,055	10	-	-	-

$R^2 = 0,9301$, R^2 (ajustado) = 0,8602

Nas Tabelas 5.11 e 5.12 encontram-se os coeficientes de regressão da equação representativa do modelo proposto para remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis*, respectivamente, com os valores de seus respectivos desvios padrão, teste t de “Student” e níveis de significância do modelo estatístico.

Tabela 5.11 - Coeficiente de Regressão, Erros-Padrão, teste t de “Student” e níveis de significância do modelo estatístico para a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *I. occidentalis*

Variáveis independentes	Coeficiente de Regressão	Erros-padrão	Valor de t (5)	Valor de p
Média/Interação	17,40091	0,330218	52,69516	0,000000
Temperatura [X ₁]	-2,02125	0,387215	-5,21996	0,003410
Agitação [X ₂]	-0,71875	0,387215	-1,85620	0,122568*
pH [X ₃]	-0,94875	0,387215	-2,45019	0,057923
X ₁ X ₂	0,81375	0,387215	2,10154	0,089578
X ₁ X ₃	4,13375	0,387215	10,67558	0,000125

*Fatores e interações não significativas

Tabela 5.12 - Coeficiente de Regressão, Erros-Padrão, teste t de “Student” e níveis de significância do modelo estatístico para a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *I. orientalis*

Variáveis independentes	Coeficiente de Regressão	Erros-padrão	Valor de t (5)	Valor de p
Média/Interação	13,22364	0,793307	16,66901	0,000014
Temperatura [X ₁]	-1,55750	0,930235	-1,67431	0,154924*
Agitação [X ₂]	-3,92750	0,930235	-4,22205	0,008311
pH [X ₃]	-5,25500	0,930235	-5,64911	0,002413
X ₁ X ₃	2,32250	0,930235	2,49668	0,054712
X ₂ X ₃	-2,58750	0,930235	-2,78156	0,038831

*Fatores e interações não significativas

Nas Tabelas 5.13 e 5.14, encontram-se a análise de variância de ajuste do modelo estatístico aos dados das Tabelas 5.11 e 5.12, onde o resíduo total foi desmembrado em falta de ajuste e erro puro, sendo este procedimento válido uma vez que foram realizadas as repetições no ponto central, para poder se obter uma estimativa do erro aleatório (erro puro), podendo assim julgar de maneira quantitativa se o modelo representa satisfatoriamente as observações.

Observa-se ainda nas Tabelas 5.13 e 5.14, que o F estimado pelos dados experimentais tanto do residual total quanto da falta de ajuste foi menor do que o F tabelado, respectivamente, indicando assim que tanto o resíduo total quanto a falta de ajuste se encontram dentro da distribuição F, ou seja, não foram estatisticamente significativos, evidenciando assim que o modelo é altamente significativo, dentro da região estudada, visto que os modelos empíricos são locais, isto é, aplicados a uma determinada região.

Tabela 5.13 - Análise de variância para o ajuste de um modelo estatístico aos dados da Tabela 5.6, que representa a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *I. occidentalis* em frascos agitados

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de P
Modelo	186,01757	5	37,2035	31,016	0,000000
Resíduos	5,99743	5	1,199486	0,7844	
Falta de ajuste	2,938896	3	0,979654	0,64	0,6570
Erro puro	3,05849	2	1,52923	-	-

$R^2 = 0,9688$, R^2 (ajustado) = 0,9375

Tabela 5.14 - Análise de variância para o ajuste de um modelo estatístico aos dados da Tabela 5.6, que representa a remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *I. orientalis* em frascos agitados

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de P
Modelo	460,4415	5	92,0883	13,3024	0,000014
Resíduos	34,6135	5	6,9227	23,6835	
Falta de ajuste	34,0289	3	11,343	38,81	0,252
Erro puro	0,5846	2	0,2923	-	-

$R^2 = 0,9301$, R^2 (ajustado) = 0,8602

Com relação aos coeficientes de determinação obtidos, as Tabelas 5.13 e 5.14 indicam que 96,88 e 93,01 %, respectivamente da variação total em torno da média são explicadas pela regressão.

Após a verificação dos fatores e interações que foram significativas e refinamento dos modelos, obteve-se as seguintes equações para representação da remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *I. occidentalis* (Y_1) e *I. orientalis* (Y_2), a partir dos coeficientes de regressão das Tabela 5.11 e 5.12, respectivamente:

$$Y_1 = 17,4009 - 2,02125.X_1 - 0,71875.X_2 - 0,94875.X_3 + 0,81375.X_1X_2 + 4,13375.X_1X_3$$

(5.1)

$$Y_2 = 13,2236 - 1,5575.X_1 - 3,9275.X_2 - 5,255.X_3 + 2,3225.X_1X_3 - 2,5875.X_2X_3$$

(5.2)

Onde: Y_1 = remoção de inibidores (%) do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Issatchenkia occidentalis*, Y_2 = remoção de inibidores (%) do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Issatchenkia orientalis*, X_1 = Fator temperatura, X_2 = Fator agitação e X_3 = Fator pH.

Para simplificação das Equações 5.1 e 5.2, o nível negativo (-1) da variável pH foi substituído nas mesmas. Quando o efeito de um fator é negativo, isto indica que a utilização de seu maior nível interfere favoravelmente no processo estudado. Desta forma foi possível plotar as superfícies de respostas (Fig. 5.26A e 5.26B), referentes à remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pelas espécies *I. occidentalis* e *I. orientalis*, respectivamente. Assim, pode-se observar pela análise de superfície de respostas das Figuras 5.26A e 5.26B, que em ambos os casos, os máximos valores em remoção de inibidores (%) ocorreram quando se utilizou todas as variáveis em seu nível negativo. Praticamente, em ambos os casos, mantendo-se o pH em seu nível negativo (-1), o fator principal agitação apresentou pouca influência na resposta estudada. Deve-se salientar que apesar da agitação ter tido pouca influência na remoção de inibidores no hidrolisado para ambas as leveduras, como constatado anteriormente, o fator de agitação em seu nível positivo (300 rpm) favoreceu a remoção de açúcares. Este fato é indesejado, visto que o hidrolisado biodestoxificado poderá ser utilizado em processos de bioconversão para produção de etanol, xilitol e outros de interesse industrial. Desta forma, a agitação deve ser fixada em nível negativo (-1) para reduzir a remoção de açúcares.

(A)

(B)

Figura 5.26 - Superfície de resposta e curvas de nível dos modelos propostos que representa remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *I. occidentalis* (A) e *I. orientalis* (B).

A

B

Figura 5.27 - Diagrama de interpretação dos efeitos entre os Fatores temperatura, agitação e pH sobre a remoção de inibidores (%) do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *I. occidentalis* (A) e *I. orientalis* (B) no planejamento completo 2^3 .

Nas Figuras 5.27A e 5.27B, observam-se as interações dos efeitos temperatura, agitação e pH apresentados nas Equações (5.1) e (5.2). Estas mesmas Figuras permitem um melhor entendimento desses efeitos de interação de segunda ordem. Nestes casos, com uma variação do fator agitação em seu nível de -1 para +1 obteve-se uma remoção de 22,97 a 26,04 % e 21,02 a 23,70 % para as leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis*, respectivamente (Figuras 5.27A e 5.27B). De certa forma, estes resultados confirmam o favorecimento na remoção de inibidores no hidrolisado ao se utilizar todas as variáveis em seus níveis negativos.

Deve-se salientar que apesar dos Fatores principais agitação e temperatura não terem sido estatisticamente significativos no nível de 90% de confiança para a remoção de inibidores por *I. occidentalis* e *I. orientalis*, respectivamente, apresentaram seus efeitos de interação significativos. No caso, da levedura *I. occidentalis* somente o fator principal temperatura apresentou todas suas interações significativas, ou seja, com os fatores agitação e pH (Tabela 5.7). Neste mesmo contexto, para a levedura *I. orientalis* o Fator pH foi o que apresentou interações significativas com os fatores temperatura e agitação. Estas observações podem ser melhores visualizadas das Figuras 5.26A e 5.26B, onde se tem uma queda maior na remoção de inibidores com alterações de temperatura para a *I. occidentalis* e pH para a *I. orientalis* (Figuras 5.27A e 5.27B).

Para a validação do modelo proposto para remoção de inibidores do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis*, foram realizados ensaios nas condições de temperatura, agitação e pH determinadas pela metodologia estatística. Para isso, o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco (H5C) teve seu pH inicial ($0,90 \pm 0,05$) elevado para 4,0, autoclavado, suplementado e inoculado com as leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis*. Os ensaios de tratamento biológico foram então conduzidos com os fatores agitação a 100 rpm (nível -1) e com a temperatura a 23 °C (nível -1) por 24 h. Com a substituição dos valores codificados nas equações 5.1 e 5.2, obtêm-se os valores estimados para a remoção de inibidores por *I. occidentalis* e *I. orientalis* de 26,03 e 23,70%, respectivamente.

Experimentalmente foram obtidos os valores de 26,14 e 23,89% de remoção de inibidores para as leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis*, respectivamente. Isto indica que os modelos podem representar matematicamente a remoção de inibidores por *I. occidentalis* e *I. orientalis* em hidrolisado de bagaço de cana com os coeficientes de determinação de 96,88 e

93,01% , respectivamente. Apesar dos resultados com relação à remoção de inibidores (%) no hidrolisado terem sido aproximadamente semelhantes para ambas as leveduras nas condições indicadas pelo modelo estatístico, como região de máxima remoção, a levedura *I. occidentalis* apresentou menor remoção de açúcares, o que de certa forma contribuiu para que esta seja a levedura indicada para futuros ensaios de biodestoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar contendo elevada concentração de açúcares. Deve-se também mencionar que a levedura *I. orientalis* apresentou maior sensibilidade a variação de pH, diminuindo consideravelmente a remoção de inibidores no hidrolisado com o aumento do pH (Figura 5.27). Fato este não observado para a levedura *I. occidentalis* (Figura 5.27).

6 CONCLUSÕES

Os resultados experimentais demonstraram que é possível um tratamento biológico para remoção de certos compostos tóxicos presentes em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098.

Essas duas espécies de leveduras estudadas apresentaram menor crescimento celular quando cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com maiores concentrações de açúcares e compostos tóxicos.

O pH durante o processo de destoxificação em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco sofreu uma redução de aproximadamente 1 unidade independente do microrganismo utilizado. Por outro lado, em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado o pH foi aumentado em até 3,6 unidades.

Não observou-se perda de volume maior que 5% durante os ensaios de biodestoxificação do hidrolisado estudado.

O hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco foi escolhido para os estudos de determinação do efeito do pH inicial, agitação e temperatura por apresentar menores reduções nas concentrações de açúcares após 24 h de bioensaio.

Para os ensaios com a levedura *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097:

A temperatura e o pH inicial demonstraram influência significativa sobre a redução na concentração dos inibidores avaliados quando destoxificado o hidrolisado de bagaço de cana com fator de concentração cinco.

A maior redução na concentração do total dos inibidores quantificados foi no ensaio em que se utilizou o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco e que todos os fatores estavam presentes no nível inferior (pH 4,0/100 rpm/23°C).

A menor redução na concentração de açúcares foi no ensaio em que se utilizou o pH inicial 5,5 sob uma agitação de 200 rpm a 30°C, e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

Para os ensaios com a levedura *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098:

A agitação e o pH inicial demonstraram influência significativa sobre a redução na concentração dos inibidores avaliados em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

A maior redução na concentração do total dos inibidores quantificados foi verificada no ensaio utilizando pH inicial 4,0, sob uma agitação de 100 rpm a 23°C, e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

A menor redução na concentração de açúcares foi observada no ensaio em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar sob as condições de 100 rpm, pH inicial 4,0 e 37°C.

A melhor condição de destoxificação com remoção média da ordem de 25% de inibidores totais foi quando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 foram cultivadas em hidrolisado de bagaço de cana com fator de concentração cinco em pH inicial de 4,0, sob 100 rpm e 23°C por 24 h. Considera-se que essas leveduras apresentam alta tolerância aos compostos inibidores, sendo capazes de reduzir suas concentrações presentes nos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Otimizar as condições experimentais do processo de biodestoxificação visando aumentar a eficiência de redução na concentração dos inibidores.

Estudar o comportamento das leveduras avaliadas em processos conduzidos em biorreator de bancada.

Avaliar a eficiência do tratamento de biodestoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em fermentações para obtenção de bioprodutos de interesse comercial.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus Níger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **B. CEPPA**, v.18, n.1, p.57-70, Jan/jun 2000.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v.5, n.4, p.309-318, 2002.
- AGROSOFT BRASIL, 2008. Disponível em: <http://www.agrosoft.com.br/index.htm>. Acesso em: 09 de janeiro de 2009.
- ALVES, L.A. **Efeito do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes tratamentos sobre a atividade da xilose redutase de *Candida guilliermondii***. 193f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo. 2001.
- AZHAR, A.F.; BERY, M.K.; COLCORD, A.R. Factors affecting alcohol fermentation of wood acid hydrolysate. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v.11, p.293-300, 1981.
- BARANOWSKI, J.D.; NAGEL, C.W. Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* by hidroxicinnamic acids and their alkyl esters. **J. Food Sci.**, v.47, p.1587-1589, 1982.
- BELAY, N.; BOOPATHY, R.; VOSKUILEN, G. Anaerobic transformation of furfural by *Methanococcus deltae* ΔLH. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.5, p.2092-2094, 1997.
- BOOPATHY, R.; BOKANG, H.; DANIELS, L. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v.11, p.147-150, 1993.
- BOOTH, I.R. Regulation of cytoplasmatic pH in bacteria. **Microbiol. Rev.**, v.49, p.359-378, 1985.
- BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, São Paulo. 2001.
- BUGOS, R.C.; SUTHERLAND, J.B.; ADLER, J.H. Phenolic compound utilization by the Soft Rot Fungus *Lecythophora hoffmannii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1882-1885, 1988.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; LOPES, S.; PARAJO, J.C.; PEREIRA, H.; GIRIO, F.M. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xilitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM 941. **Proc. Biochem.**, v.40, p.1215-1223, 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. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.81, p.152-157, 2006.
- 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. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.79, p.863-868, 2004.
- CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Biodegradation**, v.3, p.351-368, 1992.

CHANCHACHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANJIPAN, B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological Control**, v.42, p.326-335, 2007.

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.

CHENSON, A.; STEWARD, C.; WALLACE, R. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.44, n.3, p.597-603, 1982.

CORTEZ, D.V. **Influência dos produtos de degradação de lignina na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii***. 100f. Dissertação (Mestrado) Faenquil, Lorena. 2005.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMÍNGUEZ, J.M. Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.82, p.141-151, 1999.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **J. Appl. Microbiol.**, v.88, p.170-175, 2000.

DAGLEY, S.A. Biochemical Approach to Some problems of Environmental Pollution. **Essays Biochemistry**, v.11, p.81-138, 1975.

DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. (Ed.) **Antimicrobials in foods**. New York: Marcel Dekker, 1993. 647p.

DAWSON, L.; BOOPATHY, R. Cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse without enzymatic saccharification. **BioResources**, v.3, n.2, p.452-460, 2008.

DEBARATI, P.; ASHWINI, C.; GUNIAN, P.; RAKESH, J.K. Degradation of p-hydroxybenzoate via protocatechuate in *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 and *Burkholderia cepacia* RKJ200. **Current Science**, v.87, n.9, p.1263-1268, 2004.

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

DHAOUADI, H.; MARROT, B. Olive mill wastewater treatment in a membrane bioreactor: Process feasibility and performances. **Chemical Engineering Journal**, v.145, p.225-231, 2008.

DOMÍNGUEZ, J.M. **O Efecto de los Productos de Degradación originados en la explosión por vapor de Biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus***. Tesis (Doutorado). Universidad Complutense. Madrid. ISBN: 84-669-1709-8. 2003.

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.

DUARTE, H.C. **Hidrólise de bagaço de cana com ácido clorídrico concentrado**. 121f. Dissertação (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 1989.

DUARTE, L.C.; CARVALHEIRO, F.; NEVES, I.; GÍRIO, F.M. Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCM 941. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.121-124, p.413-425, 2005.

dU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb. Technol.**, v.16, p.944-956, 1994.

FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; ROSA, S.A. Preparação de xilitol por fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. **Arquivos de Biotecnologia**, v.36, n.1, 1993.

FELIPE, M.G.A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M.; SILVA, S.S. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v.35, p.171-177, 1995.

FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v.13, n.1/2, p.11-14, 1997.

FELIPE, M.G.A. Biotechnological production of xilitol from lignocellulosic materials. Lignocellulose Biodegradation. **Journal American Chemical Society**. p.300-315, 2004.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter. 1989. 613p.

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

FERRARI, M.D.; NEIROTTI, E.; ALBORNOZ, C.; SAUCEDO, E. Ethanol production from eucalyptus Wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, p.753-759, 1992.

FERRAZ, A. **Processos Fermentativos e Enzimáticos**. In Biotecnologia Industrial. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda. 2001. p.465-484.

FERREIRA-FILHO, E.X. The xylan-degrading enzyme system. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.27, p.1093-1118, 1994.

FRAZER, F.R.; McCASKEY, T.A. Wood hydrolyzate treatments for improved fermentation of sugars to 2,3-butanediol. **Biomass**. 18:31-42. 1989.

FULLER, G.; McKEON, T.A.; BILLS, D.D. (eds). **Agricultural materials as renewable resources: nonfood and industrial applications**. Washington: American Chemical Society. ACS Symposium Series. 1996. p.647.

GIBSON, D.T. **Microbial Degradation of Organic Compounds**. New York: Marcel Dekker. 1984. p. 181-294.

GONZÁLEZ, G.; HERRERA, G.; GARCIA, M.T.; PEÑA, M. Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. **Bioresource Technology**, v.80, p.137-142, 2001.

GRETHLEIN, H.E.; CONVERSE, A.O. Common aspects of acid prehydrolysis and steam explosion for pretreating wood. **Bioresour. Technol.**, v.36, p.77-82, 1991.

GRZENIA, D. L.; SCHELL, D. J.; WICKRAMASINGHE, S. R. Membrane extraction for removal of acetic acid from biomass hydrolysates. **Journal of Membrane Science**, 322:189-195, 2008.

HADDOCK, J.D., GIBSON, D.T. Purification and Characterization of the Oxygenase Component of Bophenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain LB400. **Journal of Bacteriology**, v.117, n.20, p.5834-5839, 1995.

HELLE, S.; CAMERON, D.; LAM, J.; WHITE, B.; DUFF, S. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xilose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.786-792, 2003.

HERALD, P.J.; DAVIDSON, P.M. Antibacterial activity of selected hydroxycinnamic acids. **J. Food Sci.**, v.48, p.1378-1379, 1983.

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

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.

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. **Appl. Biochemistry and Biotechnology**, v.152, n.2, p.199-212, 2008.

JONES, K.C., STRATFORD, A., WATERHOUSE, K.S., VOGT, N.B. Organic Contaminants in Welsh Soils: polinuclear Aromatic Hydrocarbons. **Environmental Science Technology**, v.13, p.540-550, 1989.

JONSSON, L.J.; PALMQVIST, E.; NILVEBRANT, N.O.; HAHN-HAGERDAL, B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.49, p.691-697, 1998.

KIM, DONG-HWAN; HONG, YOUNG-AH; PARK, HEUI-DONG. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. **Biotechnol Lett.**, v.30, n.9, p.1633-1638, 2008.

KLINKE, H.B., OLSSON, L.; THOMSEN, A.B.; AHRING, B.K. Potential inhibitors from wet oxydation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxydation and fermentation by yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, n.6, p.738-747, 2003.

KNAUF, M. MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. **International Sugar Journal**, v.106, n.1263, p.147-150, 2004.

KOENIG, K.; ANDREESEN, J.R. Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition. **J Bacteriol.**, v.172, p.5999-6009, 1990.

KOH, J.H.; SUH, H.J. Biological activities of thermo-tolerant microbes from fermented Rice bran as an alternative microbial feed additive. **Appl. Bioch. Biotech.**, 2008. DOI 10.1007/s120 10-008-83 11-3.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, p.151-172, 1993.

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial Engineering Chemical Resource**, v.48, p.3713-3729, 2009.

KURTZMAN, C.P.; SMILEY, M.J.; JOHNSON, C.J. Emendation of the genus *Issatchenkia kudriavzev* and comparison of species by deoxyribonucleic acid reassociation, mating reaction, and ascospore ultrastructure. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.30, n.2, p.503-513, 1980.

LARSSON, S.; REINMANN, S.; NILVEBRANT, N-O.; JÖNSSON, L.J. Comparison of different methods for the detoxification of lignocelluloses hydrolysates of spruce. **Appl. Biochem Biotechnol.**, v.77-79, p.91-103, 1999.

LEE, W.G.; LEE, J.S.; SHIN, C.S.; PARK, S.C.; CHANG, H.N.; CHANG, Y.K. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77-79, p.547-559, 1999.

LYND, R.L.; VAN ZYL, W.H.; McBRIDE, J.E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.577-583, 2005.

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. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.31, p.345-352, 2004.

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.

LÓPEZ, M.J.; NICHOLS, N.N.; DIEN, B.S.; MORENO, J.; BOTHAST, R. J. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.64, p.125-131, 2004.

LUO, C. et al. Identification of potencial fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v.22, p.125-138, 2002.

MÄKINEN, K.K., *et al.* Comparison of erythritol and xylitol saliva stimulants in the control of dental plaque and *Mutans streptococci*. **Caries Research**, v.35, n.2, p.129-135, 2001.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HAGERDAL, B.; JONSSON, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xilose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enz. Microb. Technol.**, v.31, p.274-282, 2002.

MARTÍNKOVÁ, L.; UHNÁKOVÁ, B.; PÁTEK, M.; NESVERA, J.; KREN, V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. **Environment International**, v.35, p.162-177, 2009.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M.E.; YORK, S.W.; PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Effect of Ca(OH)₂ treatments ("overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. **Biotechnol. Bioeng.**, v.69, p.526-536, 2000.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M.E.; WELLS, M.L.; YORK, S.W.; PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnol. Progr.**, v.17, p.287-293, 2001.

MELAJA, J.; HÄMÄLÄINEN, L. **Process for Making xilitol**. US. n. 4.008.285. 15 fev. 1997.

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

MIYAFUJI, H.; DANNER, H.; NEUREITER, M.; THOMASSER, C.; BVOCHORA, J.; SZOLAR, O.; BRAUN, R. Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.396-400, 2003.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. Central pathways of carbohydrate metabolism. In: **Microbial physiology**, Moat AG, Foster JW and Spector MP(eds), New York: Wiley-Liss, p.363. 2002.

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

MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. Optimal experimental condition for hemicellulosic hydrolysate treatment with activated charcoal for xilitol production. **Biotechnol. Prog.**, v.20, p.134-139, 2004.

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

NCYC. **Yeast Identification, Culture and Safe Deposit Services**, United Kingdom. Disponível em: <http://www.ncyc.co.uk/>. Acesso: 15 de maio de 2009.

NICHOLS N.N.; DIEN, B.S. GUISSADO, G.M.; LÓPEZ, M.J. Bioabatement to remove inhibitors from biomass-derived sugar hydrolysates. **Appl Biochem Biotechnol.**, v.121, p.379-390, 2005.

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.

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

NILVEBRANT, N.O.; REIMANN, A.; LARSSON, S.; JÖNSSON, L.J. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates with ion-exchange resins. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.91-93, p.35-49, 2001.

NYCHAS, G.J.E. **Natural antimicrobials from plants**. In: GOULD, G.W. (Ed.). New methods of food preservation. Londres: Blackie Academic & Professional. 1995. p.59-87.

OLSSON, L. HAHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G. Kinetics of ethanol production by recombinant *Escherichia coli* K011. **Biotechnol. Bioeng.**, v.45, p.356-365, 1995.

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.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; SZENGEL, Z.; ZACCHI, G.; RECZEY, K. Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysate obtained after pretreatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v.20, p.286-293, 1997.

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

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technol.**, v.74, p.25-33, 2000b.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D.J.; SADDLER, J.N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with content high residual lignin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121/124, p.1069-1080, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.69-80, 2000.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. **Enzymes Microbiology Technologic**, v.21, p.18-24, 1997.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technol.**, v.66, p.25-40, 1998.

PEREGO, P.; CONVERTI, A.; PALAZZI, E.; DEL BORGHI, M.; FERRAILOLO, G. Fermentation of hardwood hemicellulose hydrolysate by *Pachysolen tannophilus*, *C. shehate* and *Pichia stipitis*. **Journal Industrial Microbiology**, v.6, p.157-164, 1990.

PESSOA JUNIOR, A, MANCILHA, I.M., SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.14, n.3, p.291-297, 1997.

PETERSSON A.; ALMEIDA, J.R.M.; MODIG, T.; KARHUMAA, K.; HAHN-HÄGERDAHL, B.; GORWA-GRAUSLIND, M.F.; et al. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. **Yeast**, v.23, p.455-464, 2006.

PIVETTA, L.R.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Comparação de metodologias de destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana para a produção de xilitol por via fermentativa. In: **ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 12., 2008.

RABENHORST, J. Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by transformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.49, p.309-314, 1998.

RAMALHO, P.A.; CARDOSO, M.H.; CAVACO-PAULO, A.; RAMALHO, M.T. Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.4, p.2279-2288, 2004.

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. Biochem.**, v.26, p.15-21, 1991.

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.18, n.3, p.299-311, 2001.

ROSSELL, C.E.V. **Conversion of lignocellulose biomass (bagasse and straw) from the sugar-alcohol industry into bioethanol**. Industrial Perspectives for Bioethanol. Ed. Telma Franco. 2006. Cap. 8, p.123-142. ISBN 85-98951-06-4.

SAHA, B.C. Hemicellulose Bioconversion. **J. of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.279-291, 2003.

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.

SANCHES, B.; BAUTISTA, S. Effects of furfural and 5-hidroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial technology**, v.10, p.315-318, 1988.

SANTANA, J.; SOUZA, S.O. Subprodutos da cana-de-açúcar. **Informe Agropecuário**, v.10, p.22-26, 1984.

SARROUH, B.F.; BRANCO, R.F.; SILVA, S.S. Biotechnological production of xylitol: Enhancement of monosaccharide production by post-hydrolysis of dilute acid sugarcane hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.153, n.1-3, p.163-170, 2009.

SEO, SUNG-HEE; RHEE, CHANG-HO; PARK, HEUI-DONG. Degradation of malic acid by *Issatchenkia orientalis* KMBL 5774, an acidophilic yeast strain isolated from Korean grape wine pomace. **The Journal of Microb.**, v.45, n.6, p.521-527, 2007.

SHIN, H.T.; LIM, Y.B.; KOH, J.H.; KIM, J.Y.; BAIG, S.Y.; LEE, J.H. Growth of *Issatchenkia orientalis* in aerobic batch and fed-batch cultures. **The Journal of Microb.**, v.40, n.1, p.82-85, 2002.

SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; LUCHESE, R.H.; SILVA, S.S. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Braz. J. Microbiol.**, v.35, n.3, p.248-254, 2004. DOI: 10.1590/S1517-83822004000200014

SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M. Factors that affect the biosynthesis of xilitol by xylose-fermentation yeasts – A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70/72, p.331-339, 1998.

SILVA, S.S.; SANTOS, J.C.; CARVALHO, W.; ARACAVA, K.K.; VITOLO, M. Use of fluidized bed operated in semi-continuous mode for xylose-to-xylitol conversion by *Candida guilliermondii* immobilized on porous glass. **Process Biochemistry**, v.38, n.6, p.903-907, 2003.

SILVA, S.S.; MUSSATO, S.; SANTOS, J.C.; SANTOS, D.T.; POLIZEL, J. Cell immobilization and xylitol production using sugarcane bagasse as raw material. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.141, p.215-227, 2007.

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**, 7ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technol.**, v.83, n.1-11, 2002.

SZMRECSÁNYI, T. Tecnologia e degradação ambiental: o caso da agroindústria canavieira no Estado de São Paulo. **Revista Informações Econômicas**, v.24, n.10, 1994.

TAHERZADEH, M.J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Acetic acid-friend or foe in anaerobic batch conversion of glucosa to etanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical Engineering Science**, v.52, n.15, p.2653-2659, 1997.

TAHERZADEH, M.J. **Ethanol from Lignocellulose**: Physiological Effects of Inhibitors and Fermentation Strategies. Department of Chemical Reaction Engineering, Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden, 1999.

TAHERZADEH, M.J., GUSTAFSSON, L., NIKLASSON, C LIDÉN, G. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.53, p.701-708, 2000a.

TAHERZADEH, M.J.; NIKLASSON, C.; LIDEN, G. On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. **Biotechnol. Bioeng.**, v.69, p.330-338, 2000b.

TEIXEIRA, F.A.; PIRES, A.V.; NASCIMENTO, N.P.V. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos. **Revista eletrônica de Veterinária**, v.8, n.6, p.1-9, 2007.

TOPAKAS, E.; KALOGERIS, E.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. **Lebensmittel - Wissenschaft Technologie**, v.36, p.561-565, 2003.

VAN ZYL, C.; PRIOR, B.A.; Du PREEZ, J.C. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Enzyme Microb. Technol.**, v.13, p.82-86, 1991.

VERDUYN, C. et al. Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.405-412, 1990.

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

VIÑALS, M.V. **Aplicação de resinas de troca iônica no tratamento de hidrolisado hemicelulósico para processos fermentativos**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena. Depto. de biotecnologia. Pós-graduação em Biotecnologia Industrial. Lorena. São Paulo. 2001.

WANG, P.; BREHCHLEY, J.; HUMPHREY, A. Screening microorganisms for utilization of furfural and possible intermediates in its degradative pathway. **Biotechnology Letters**, v.16, n.9, p.977-982, 1994.

WILSON, J.J.; DESCHATELETS, L.; NISHIKAWA, N.K. Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam-pretreated aspen wood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.31, p.592-596, 1989.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Biotechnology**, v.86, n.1, p.1-14, 1998.

YU, X.Q.; BELHAJ, A.; ELMERICH, C.; LIN, M. Diversity of degradation pathways of some aromatic compounds by phenotype and genotype testing in *Acinetobacter* strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.20, p.623–627, 2004.

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.

ZALVIDAR, J., NIELSEN, J., OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl Microbiol. Biotechnol.**, v.56, p.17-34, 2001.

ZHAO, X.; WANG, L.; LIU, D. Peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.83, p.950-956, 2008.

APÊNDICES

Apêndice A. Curvas de calibração da concentração celular, de açúcares, ácido acético, furanos, siringaldeído e ácido ferúlico

◆ Concentração celular

Issatchenkia occidentalis CCTCC M 206097

$$DO_{(600\text{ nm})} = 2,3585 \cdot \text{Células (g/L)} + 0,0154 \quad (R^2 = 0,9989)$$

Issatchenkia orientalis CCTCC M 206098

$$DO_{(600\text{ nm})} = 4,1397 \cdot \text{Células (g/L)} + 0,0184 \quad (R^2 = 0,9996)$$

◆ **Açúcares**

Glicose: Área = $8,76 \times 10^5$ Glicose (g/L) + $1,09 \times 10^4$

Xilose: Área = $8,76 \times 10^5$ Xilose (g/L) + $1,48 \times 10^4$

Arabinose: Área = $8,35 \times 10^5$ Arabinose (g/L) + $1,50 \times 10^4$

◆ **Furanos**

Furfural: Área = $2,14 \times 10^8$ Furfural (g/L) + $5,44 \times 10^2$

5-Hidroximetilfurfural: Área = $1,56 \times 10^8$ HMF (g/L) + $6,27 \times 10^2$

◆ **Compostos Fenólicos**

Ácido Ferúlico: Área = $5,39 \times 10^7$ Ácido Ferúlico (g/L) + $9,85 \times 10^3$

Siringaldeído: Área = $3,22 \times 10^7$ Siringaldeído (g/L) + $2,84 \times 10^3$

◆ **Ácido Acético:** Área = $4,47 \times 10^5$ Ácido Acético (g/L) - $2,00 \times 10^4$

Apêndice B. Tabelas dos resultados do crescimento celular e variação de pH durante os ensaios de biodestoxificação com as leveduras do gênero *Issatchenkia*

Tabela B.1. Crescimento celular das linhagens *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não concentrado e com fator de concentração cinco

Hidrolisado	Leveduras	N° Células/mL			
		T ₀ (0,5 g/L)	T _{24h}	T _{48h}	T _{72h}
HNC	<i>I. occidentalis</i>	3,3 x 10 ⁷	5,2 x 10 ⁷	6,7 x 10 ⁷	9,8 x 10 ⁷
	<i>I. orientalis</i>	6,0 x 10 ⁷	17 x 10 ⁷	26 x 10 ⁷	24 x 10 ⁷
H5C	<i>I. occidentalis</i>	3,3 x 10 ⁷	4,1 x 10 ⁷	3,7 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁷
	<i>I. orientalis</i>	6,0 x 10 ⁷	5,5 x 10 ⁷	7,1 x 10 ⁷	7,6 x 10 ⁷

Tabela B.2. Variação do pH ao longo do processo de biodestoxificação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana-de-açúcar original e com fator de concentração cinco quando empregadas as linhagens *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098

Hidrolisado	Leveduras	Variação de pH			
		T ₀ (0,5 g/L)	T _{24h}	T _{48h}	T _{72h}
HNC	<i>I. occidentalis</i>	5,50	8,00	8,76	9,10
	<i>I. orientalis</i>	5,50	8,50	9,10	9,00
H5C	<i>I. occidentalis</i>	5,50	4,83	4,76	4,69
	<i>I. orientalis</i>	5,50	4,90	4,84	4,80

Apêndice C. Tabelas dos resultados do consumo de açúcares, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido ferúlico e siringaldeído durante os ensaios de biodestoxificação com as leveduras *I. occidentalis* e *I. orientalis*

Tabela C.1. Consumo de D-xilose (g/L) presente em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar original e com fator de concentração 5 para as linhagens *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098

Hidrolisado	Leveduras	Concentração de D-xilose (g/L)				% Consumo
		T ₀	T _{24h}	T _{48h}	T _{72h}	
HNC	<i>I. occidentalis</i>	11,30	8,10	7,10	5,70	49,5
	<i>I. orientalis</i>	11,30	10,70	10,40	10,0	11,5
H5C	<i>I. occidentalis</i>	51,50	51,20	50,90	50,20	2,5
	<i>I. orientalis</i>	51,50	50,20	47,10	46,50	9,7

Tabela C.2. Consumo de D-glicose (g/L) presente em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar original e com fator de concentração 5 para as linhagens *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098

Hidrolisado	Leveduras	Concentração de D-glicose (g/L)				% Consumo
		T ₀	T _{24h}	T _{48h}	T _{72h}	
HNC	<i>I. occidentalis</i>	0,37	0	0	0	100,0
	<i>I. orientalis</i>	0,37	0	0	0	100,0
H5C	<i>I. occidentalis</i>	1,83	1,83	1,82	1,81	1,1
	<i>I. orientalis</i>	1,83	0,38	0	0	100,0

Tabela C.3. Consumo de L-arabinose (g/L) presente em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar original e com fator de concentração 5 para as linhagens *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098

Hidrolisado	Leveduras	Concentração de L-arabinose (g/L)				% Consumo
		T ₀	T _{24h}	T _{48h}	T _{72h}	
HNC	<i>I. occidentalis</i>	0,97	0	0	0	100,0
	<i>I. orientalis</i>	0,97	1,24	0	0	100,0
H5C	<i>I. occidentalis</i>	4,90	4,79	5,20	4,72	3,7*
	<i>I. orientalis</i>	4,90	4,17	4,99	5,48	*

*Durante o processo de destoxificação foi observado aumento na concentração deste açúcar provavelmente pela formação de outro composto interferindo na leitura.

Tabela C.4. Consumo de ácido acético (g/L) presente em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar original e com fator de concentração 5 para as linhagens *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098

Hidrolisado	Leveduras	Concentração de Ácido acético (g/L)				% Consumo
		0 h	24 h	48 h	72 h	
HNC	<i>I. occidentalis</i>	1,13	0,50	0	0	100,0
	<i>I. orientalis</i>	1,13	1,10	1,03	0,96	15,0
H5C	<i>I. occidentalis</i>	3,30	3,30	3,20	3,10	6,1
	<i>I. orientalis</i>	3,30	3,30	3,30	3,30	0,0

Tabela C.5. Consumo de furfural (g/L) presente em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar original e com fator de concentração 5 para as linhagens *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098

Hidrolisado	Leveduras	Concentração de Furfural (g/L)				% Consumo
		T ₀	T _{24h}	T _{48h}	T _{72h}	
HNC	<i>I. occidentalis</i>	0,0018	0	0	0	100,0
	<i>I. orientalis</i>	0,0018	0,0018	0	0	100,0
H5C	<i>I. occidentalis</i>	0,016	0,005	0	0	100,0
	<i>I. orientalis</i>	0,016	0,007	0	0	100,0

Tabela C.6. Consumo de 5-hidroximetilfurfural (g/L) presente em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar original e com fator de concentração 5 para as linhagens *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098

Hidrolisado	Leveduras	Concentração de 5-Hidroximetilfurfural (g/L)				% Consumo
		T ₀	T _{24h}	T _{48h}	T _{72h}	
HNC	<i>I. occidentalis</i>	0,004	0	0	0	100,0
	<i>I. orientalis</i>	0,004	0,002	0	0	100,0
H5C	<i>I. occidentalis</i>	0,02	0,003	0	0	100,0
	<i>I. orientalis</i>	0,02	0,004	0,003	0,003	85,0

Tabela C.7. Consumo de ácido ferúlico (g/L) presente em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar original e com fator de concentração 5 para as linhagens *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098

Hidrolisado	Leveduras	Concentração de Ácido Ferúlico (g/L)				% Consumo
		T ₀	T _{24h}	T _{48h}	T _{72h}	
HNC	<i>I. occidentalis</i>	0,08	0,03	0,01	0	100,0
	<i>I. orientalis</i>	0,08	0	0	0	100,0
H5C	<i>I. occidentalis</i>	0,30	0,08	0,08	0,07	76,7
	<i>I. orientalis</i>	0,30	0,30	0,26	0,25	16,7

Tabela C.8. Consumo de siringaldeído (g/L) presente em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar original e com fator de concentração 5 para as linhagens *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098

Hidrolisado	Leveduras	Concentração de Siringaldeído (g/L)				% Consumo
		T ₀	T _{24h}	T _{48h}	T _{72h}	
HNC	<i>I. occidentalis</i>	0,27	0,16	0,09	0,02	92,6
	<i>I. orientalis</i>	0,27	0,12	0,07	0,03	88,9
H5C	<i>I. occidentalis</i>	0,60	0,20	0,18	0,18	70,0
	<i>I. orientalis</i>	0,60	0,57	0,55	0,50	16,7

Apêndice D. Microfotografia das linhagens de *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e de *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 cultivadas em diferentes meios e tempo de crescimento

Figura D.1. Microfotografia das linhagens (a) *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e (b) *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 após 24 h de cultivo em meio sintético.

Figura D.2. Microfotografia das linhagens (a) *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e (b) *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 no início do processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

Figura D.3. Microfotografia das linhagens (a) *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 e (b) *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 após 6 horas de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com fator de concentração cinco.

Apêndice E. Fluxograma de execução do trabalho.