

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ITALO DE ANDRADE BIANCHINI

Aproveitamento do bagaço e palha de cana-de-açúcar na produção de xilitol por *Candida tropicalis*: Influência dos compostos tóxicos no metabolismo celular

Lorena

2022



ITALO DE ANDRADE BIANCHINI

Aproveitamento do bagaço e palha de cana-de-açúcar na produção de xilitol por *Candida tropicalis*: Influência dos compostos tóxicos no metabolismo celular

Dissertação apresentada à 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 de Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe

Coorientadora: Profa. Dra. Talita Martins Lacerda

Versão Corrigida

Lorena

2022

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado  
da Escola de Engenharia de Lorena,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bianchini, Italo de Andrade  
Aproveitamento do bagaço e palha de cana-de-açúcar  
na produção de xilitol por *Candida tropicalis*:  
Influência dos compostos tóxicos no metabolismo  
celular / Italo de Andrade Bianchini; orientadora  
Maria das Graças de Almeida Felipe - Versão  
Corrigida. - Lorena, 2022.  
109 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de  
Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de  
Lorena da Universidade de São Paulo. 2022

1. Hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de  
cana-de-açúcar. 2. Inibidores de origem  
lignocelulósica. 3. Adaptação celular. 4. *Candida  
tropicalis*. 5. Xilitol. I. Título. II. Felipe, Maria  
das Graças de Almeida, orient.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ediomar e Rosa, por sempre acreditarem em mim e no meu potencial, por não medirem esforços para que meus sonhos acontecessem e por todo o apoio, dedicação e suporte. Agradeço também ao meu irmão, Guilherme, pela parceria e amizade.

Ao meu namorado, Matheus, por todo o apoio, compreensão e amor e por sempre me estimular e vibrar com as minhas conquistas.

À minha orientadora, Maria das Graças pela dedicação, confiança e conhecimentos compartilhados ao longo destes anos. Também agradeço por sempre me estimular a aproveitar as oportunidades oferecidas.

À professora Talita, pela coorientação, suporte e disposição em auxiliar no desenvolvimento deste projeto

Aos amigos e colegas da pós, Diana, Fernanda, Lívia, Otto, Tati e Will, pelos auxílios em experimentos e conhecimentos compartilhados, além de todas as risadas, conversas jogadas foras e momentos de descontração que deixaram essa jornada mais leve. Agradeço especialmente à Ana Maria, Fanny, Sarah, Thércia e Uira pela amizade além das paredes da universidade e pelos inúmeros momentos inesquecíveis.

Aos amigos de Volta Redonda e Viçosa, pela amizade e por estarem comigo, mesmo que à distância e muitas vezes não entendendo a minha pesquisa, mas mesmo assim vibrando com cada uma das minhas conquistas.

Aos funcionários do Departamento de Biotecnologia, do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial e da Comissão de Pós-Graduação pela disposição em ajudar.

À Universidade de São Paulo pelas oportunidades oferecidas e por fornecer a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológica (CNPq) pela bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido através do processo n° 2019/27092-9.

A todos que torceram por mim: gratidão!



## RESUMO

BIANCHINI, I.A. **Aproveitamento do bagaço e palha de cana-de-açúcar na produção de xilitol por *Candida tropicalis*: Influência dos compostos tóxicos no metabolismo celular**. 2022. 109p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

Uma das etapas chaves da produção biotecnológica de xilitol a partir do bagaço e da palha de cana-de-açúcar é a desconstrução da parede celular vegetal, uma vez que este processo solubiliza os açúcares constituintes da hemicelulose, permitindo a conversão da xilose a xilitol por leveduras assimiladoras de pentoses. Contudo, inibidores microbianos de origem lignocelulósica formados/liberados nessa etapa, como ácido acético, furanos e compostos fenólicos, inibem a produção de xilitol durante a fermentação. A adaptação celular se apresenta como uma estratégia para superar a toxicidade destes inibidores, uma vez que desenvolvem microrganismos robustos e tolerantes, contribuindo para a melhoria da performance microbiana frente a toxicidade do hidrolisado. Esta estratégia pode ainda ser empregada de forma complementar aos procedimentos de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos usualmente realizados para ampliar ainda mais a tolerância microbiana aos inibidores de origem lignocelulósica. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a adaptação de *Candida tropicalis* FTI 20037 ao hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana (HHBP) visando a superação da toxicidade do hidrolisado, bem como o aumento da produção de xilitol. Para isso, a levedura foi adaptada ao HHBP obtido por hidrólise ácida diluída com diferentes características químicas (hidrolisados original, concentrado e concentrado/destoxificado) e empregada em fermentações do HHBP concentrado e destoxificado para avaliação do efeito da adaptação sobre sua fermentabilidade, bem como de possíveis alterações fisiológicas e metabólicas entre as linhagens adaptada e original. A adaptação da levedura ao HHBP concentrado e destoxificado aumentou o rendimento de xilitol e a eficiência de conversão de xilose em xilitol em 13,3 %, a produtividade volumétrica de xilitol em 7,1 % e a velocidade específica de produção de xilitol em 9,7 %. Foi observado ainda, para esta condição, uma melhoria no consumo de 5-HMF em relação às células não adaptadas. As estratégias adaptativas avaliadas, contudo, não proporcionaram melhorias no consumo de glicose e xilose, enquanto para a arabinose foi observado um aumento do consumo quando *C. tropicalis* foi adaptada ao HHBP e ao HHBP concentrado e destoxificado. Células adaptadas aos três hidrolisados apresentaram uma diminuição na remoção de fenólicos totais ao longo das fermentações, indicando possíveis alterações fisiológicas em função da adaptação celular. Quanto ao consumo de ácido acético, não foram observadas diferenças entre as condições avaliadas. Em relação à membrana plasmática da levedura, não foram observadas diferenças em sua integridade quando *C. tropicalis* foi cultivada no HHBP concentrado e destoxificado após 24 e 48 h, provavelmente devido a mecanismos de tolerância expressos. A maior proporção de células com a membrana não íntegra foi observada na fermentação em meio semidefinido devido à drástica queda do pH nas primeiras horas de fermentação. Conclui-se que a adaptação de *C. tropicalis* ao HHBP concentrado e destoxificado foi a estratégia adaptativa mais eficaz, uma vez que favoreceu a produção de xilitol, o consumo de arabinose e contribuiu para o desenvolvimento de um fenótipo mais tolerante à toxicidade do HHBP.

**Palavras-chave:** Hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana-de-açúcar. Inibidores de origem lignocelulósica. Adaptação celular. *Candida tropicalis*. Xilitol.

## ABSTRACT

BIANCHINI, I.A. **Use of sugarcane bagasse and straw in the xylitol production by *Candida tropicalis*: Influence of toxic compounds on cellular metabolism.** 2022. 109p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

One of the key steps of the biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse and straw is the plant cell wall deconstruction. It solubilizes sugars from hemicellulose, allowing the xylose-to-xylitol conversion by pentose-assimilating yeasts. However, lignocellulosic inhibitors formed/released at this step, such as acetic acid, furans, and phenolic compounds, inhibit xylitol production throughout fermentation. Cell adaptation is a strategy used to overcome the toxicity of these inhibitors through the development of robust and tolerant strains, contributing to the improvement of the microbial performance against hydrolysate toxicity. It can also be used in association to hemicellulosic hydrolysate detoxification to give yeast extra tolerance to lignocellulosic inhibitors. This work aimed to evaluate the adaptation of *Candida tropicalis* FTI 20037 to sugarcane bagasse and straw hemicellulosic hydrolysate (HHBP) to overcome the hydrolysate toxicity and increase xylitol production. Yeast was adapted to HHBP obtained by dilute acid hydrolysis with different chemical characteristics (original, concentrated, and concentrated/detoxified hydrolysates) and submitted to concentrated/detoxified HHBP fermentations to evaluate the effect of adaptation on its fermentability as well as possible physiological and metabolic changes among adapted and original strains. Yeast adaptation to concentrated/detoxified HHBP increased xylitol yield and xylose-to-xylitol conversion efficiency by 13.3 %, xylitol volumetric productivity by 7.1 %, and xylitol specific production rate by 9.7 %. It was also observed, for this condition, an improvement in 5-HMF degradation compared to non-adapted cells. The evaluated adaptive strategies did not improve glucose and xylose consumption. However, an increase in arabinose consumption was observed when *C. tropicalis* was adapted to HHBP and to concentrated/detoxified HHBP. Cells adapted to all three hydrolysates exhibited a decrease in total phenolic compounds reduction throughout fermentations, indicating possible physiological changes due to cellular adaptation. For acetic acid consumption, no differences were observed between the evaluated conditions. Regarding plasmatic membrane, there were no differences in its integrity when *C. tropicalis* was grown in concentrated and detoxified HHBP after 24 and 48 h, probably due to expressed tolerance mechanisms. The highest proportion of cells with not intact membrane occurred in the semi-defined medium fermentation due to the drastic pH drop in the first hours of fermentation. It is concluded that adaptation of *C. tropicalis* to concentrated/detoxified HHBP was the most effective strategy as it favored both xylitol production and arabinose consumption as well as contributed to the development of a more tolerant phenotype against HHBP toxicity.

**Keywords:** Sugarcane bagasse and straw hemicellulosic hydrolysate. Lignocellulosic inhibitors. Cellular adaptation. *Candida tropicalis*. Xylitol.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Composição da parede celular de biomassas lignocelulósicas em termos de seus constituintes principais: celulose, hemiceluloses e lignina. Adaptado de Rubin (2008). .... 15
- Figura 2.** Metabolismo dos principais carboidratos presentes em hidrolisados hemicelulósicos por leveduras assimiladoras de pentoses. Baseado em Arruda (2011) e Bettiga et al. (2009). ..... 23
- Figura 3.** Desconstrução da parede celular vegetal de biomassas lignocelulósicas. Adaptado de Mood et al. (2013). ..... 25
- Figura 4.** Despolimerização e solubilização de açúcares e solubilização/formação de inibidores durante a hidrólise ácida diluída de biomassas lignocelulósicas. Baseado em Jönsson et al. (2013). ..... 26
- Figura 5.** Diagrama de fluxo das etapas realizadas no presente trabalho. .... 45
- Figura 6.** Bagaço de cana (A), palha de cana (B) e mistura de bagaço e palha de cana (1:1) (C). ..... 46
- Figura 7.** Consumo de açúcares, formação de células e xilitol e variação de pH nas fermentações em meio semidefinido contendo glicose e xilose (A) e no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (B), adaptado ao hidrolisado concentrado e destoxificado (C), adaptado ao hidrolisado original (D) e adaptado ao hidrolisado concentrado (E). ..... 64
- Figura 8.** Rendimento (A) e produtividade volumétrica de xilitol (B) e eficiência de conversão de xilose em xilitol das fermentações realizadas empregando inóculo adaptado e não adaptado. Letras iguais não diferenciam estatisticamente as condições avaliadas (Tukey,  $p < 0,05$ ). ..... 69
- Figura 9.** Produção e consumo de etanol e glicerol nas fermentações em meio semidefinido contendo glicose e xilose (A) e no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (B), adaptado ao hidrolisado concentrado e destoxificado (C), adaptado ao hidrolisado original (D) e adaptado ao hidrolisado concentrado e não destoxificado (E). ..... 74
- Figura 10.** Variação das concentrações de ácido acético, furfural, 5-HMF e fenólicos totais ao longo das fermentações no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (A), adaptado ao hidrolisado concentrado e destoxificado (B), adaptado ao hidrolisado original (C) e adaptado ao hidrolisado concentrado e não destoxificado (D). . 77
- Figura 11.** Redução da concentração de compostos fenólicos ao longo das fermentações no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (Fermentação 2), adaptado ao hidrolisado concentrado e destoxificado (Fermentação 3), adaptado ao hidrolisado original (Fermentação 4) e adaptado ao hidrolisado concentrado e não destoxificado (Fermentação 5). Letras iguais não diferenciam estatisticamente as condições avaliadas (Tukey,  $p < 0,05$ ). ..... 80
- Figura 12.** Variação da concentração de ácido gálico, pirocatecol, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, vanilina, siringaldeído, ácido p-cumárico e ácido ferúlico ao longo das fermentações em HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (A), adaptado ao hidrolisado concentrado e destoxificado (B), adaptado ao hidrolisado original (C) e adaptado ao hidrolisado concentrado e não destoxificado (D). . 81

**Figura 13.** Micrografias do controle positivo da análise de integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* autoclavada a 115 °C por 15 min (A) e campo claro do controle positivo (B). Autofluorescência (controle negativo) de *C. tropicalis* sem adição do iodeto de propídeo (C) e campo claro do controle negativo (D). Visualização no microscópio de fluorescência aplicando um aumento de 400X. ....85

**Figura 14.** Micrografias da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* cultivada em meio semidefinido contendo xilose e glicose como fontes de carbono (fermentação 1) após 0 h (A), 24 h (C) e 48 h (D) de cultivo. Visualização do campo claro das lâminas observadas após 0 h (B), 24 h (D) e 48 h (F) de cultivo. A levedura foi visualizada no microscópio de fluorescência aplicando um aumento de 200X.....87

**Figura 15.** Micrografias da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* cultivada em HHBP (fermentação 2) após 0 h (A), 24 h (C) e 48 h (D) de cultivo. Visualização do campo claro das lâminas observadas após 0 h (B), 24 h (D) e 48 h (F) de cultivo. A levedura foi visualizada no microscópio de fluorescência aplicando um aumento de 200X. ....88

**Figura 16.** Micrografias da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* adaptada ao hidrolisado concentrado e destoxificado cultivada em HHBP (fermentação 3) após 0 h (A), 24 h (C) e 48 h (D) de cultivo. Visualização do campo claro das lâminas observadas após 0 h (B), 24 h (D) e 48 h (F) de cultivo. A levedura foi visualizada no microscópio de fluorescência aplicando um aumento de 200X. ....89

**Figura 17.** Micrografias da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* adaptada ao hidrolisado original cultivada em HHBP (fermentação 4) após 0 h (A), 24 h (C) e 48 h (D) de cultivo. Visualização do campo claro das lâminas observadas após 0 h (B), 24 h (D) e 48 h (F) de cultivo. A levedura foi visualizada no microscópio de fluorescência aplicando um aumento de 200X. ....90

**Figura 18.** Micrografias da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* adaptada ao hidrolisado concentrado e não destoxificado cultivada em HHBP (fermentação 5) após 0 h (A), 24 h (C) e 48 h (D) de cultivo. Visualização do campo claro das lâminas observadas após 0 h (B), 24 h (D) e 48 h (F) de cultivo. A levedura foi visualizada no microscópio de fluorescência aplicando um aumento de 200X. ....91

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Benefícios do xilitol sob a saúde humana e aplicações na medicina. (Arcaño et al., 2020; Benahmed et al., 2020; Hernández-Pérez et al., 2019; Korponyai et al., 2017; Mussatto, 2012); Umino et al., 2019) ..... 21
- Tabela 2.** Caracterização química estrutural do bagaço e palha de cana-de-açúcar, separados e em mistura (1:1), e da celulignina. Balanço de massa do processo de hidrólise ácida diluída..... 56
- Tabela 3.** Composição química do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1) obtido por hidrólise ácida diluída, concentrado à vácuo (FC = 5,5) e destoxificado..... 59
- Tabela 4.** Velocidades volumétricas e específicas de consumo de glicose e xilose nas fermentações em meio semidefinido contendo glicose e xilose (1) e no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (2) e adaptado aos hidrolisados concentrado e destoxificado (3), original (4) e concentrado (5). Letras iguais em sobrescrito na mesma coluna não diferenciam estatisticamente as condições avaliadas (Tukey,  $p < 0,05$ ). ..... 65
- Tabela 5.** Velocidades volumétricas e específicas de consumo de arabinose nas fermentações no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (2) e adaptado aos hidrolisados concentrado e destoxificado (3), original (4) e concentrado e não destoxificado (5). Letras iguais em sobrescrito na mesma coluna não diferenciam estatisticamente as condições avaliadas (Tukey,  $p < 0,05$ )..... 67
- Tabela 6.** Velocidades volumétricas e específicas de produção de etanol para as fermentações em meio semidefinido contendo glicose e xilose (1) e no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (2) e adaptado aos hidrolisados concentrado e destoxificado (3), original (4) e concentrado e não destoxificado (5). Letras iguais em sobrescrito na mesma coluna não diferenciam estatisticamente as condições avaliadas (Tukey,  $p < 0,05$ ). ..... 75



## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2.1 Biomassas lignocelulósicas.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2.2 Bagaço e palha de cana-de-açúcar.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>2.3 Xilitol .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>2.4 Hidrolisados hemicelulósicos.....</b>   | <b>24</b> |
| 2.4.1 <i>Toxicidade de hidrolisados hemicelulósicos .....</i>  | <i>28</i> |
| 2.4.2 <i>Alterações metabólicas induzidas por inibidores presentes em hidrolisados.....</i>  | <i>33</i> |
| 2.4.3 <i>Mecanismos de tolerância aos inibidores presentes em hidrolisados .....</i>   | <i>36</i> |
| <b>2.5 Adaptação celular.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>3.1 Objetivo geral .....</b>  | <b>44</b> |
| <b>3.2 Objetivos específicos .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>45</b> |
| <b>4.1 Matéria-prima .....</b>   | <b>45</b> |
| <b>4.2 Caracterização química estrutural da biomassa <i>in natura</i> e da celulignina.....</b>                                    | <b>46</b> |
| 4.2.1 <i>Extrativos.....</i>   | <i>46</i> |
| 4.2.2 <i>Lignina solúvel, lignina insolúvel e açúcares .....</i>   | <i>46</i> |
| 4.2.3 <i>Cinzas .....</i>  | <i>47</i> |
| <b>4.3 Obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico da mistura 1:1 de bagaço e palha de cana-de-açúcar (HHBP) .....</b>        | <b>48</b> |
| 4.3.1 <i>Hidrólise ácida diluída.....</i>  | <i>48</i> |
| 4.3.2 <i>Concentração à vácuo .....</i>  | <i>48</i> |
| 4.3.3 <i>Destoxificação .....</i>  | <i>48</i> |
| 4.3.4 <i>Caracterização do hidrolisado hemicelulósico.....</i>   | <i>49</i> |
| <b>4.4 Avaliação da fermentabilidade do HHBP concentrado e destoxificado frente a adaptação de <i>Candida tropicalis</i> .....</b> | <b>49</b> |
| 4.4.1 <i>Microrganismo e preparo do inóculo.....</i>   | <i>49</i> |
| 4.4.2 <i>Adaptação do inóculo.....</i>   | <i>49</i> |
| 4.4.3 <i>Fermentações .....</i>  | <i>50</i> |
| <b>4.5 Métodos analíticos.....</b>   | <b>52</b> |
| 4.5.1 <i>Determinação da concentração e viabilidade celular .....</i>  | <i>52</i> |
| 4.5.2 <i>Determinação das concentrações de açúcares, xilitol, etanol, glicerol, ácido acético, furanos e fenólicos .....</i>       | <i>52</i> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 4.5.3      | <i>Determinação da concentração de compostos fenólicos totais</i> .....   | 53        |
| 4.5.4      | <i>Integridade de membrana plasmática</i> .....   | 53        |
| <b>5</b>   | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>55</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Caracterização química estrutural da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1)</b> .....                                     | <b>55</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana (1:1)</b> .....                                | <b>58</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Avaliação do efeito da adaptação do inóculo sob a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana</b> ..... | <b>63</b> |
| 5.3.1      | <i>Bioconversão de xilose em xilitol</i> .....  | 63        |
| 5.3.2      | <i>Produção dos subprodutos etanol e glicerol</i> .....   | 73        |
| 5.3.3      | <i>Variação da concentração de inibidores</i> .....   | 76        |
| <b>5.4</b> | <b>Avaliação do efeito do HHBP sob a integridade de membrana plasmática de <i>C. tropicalis</i></b> .....                               | <b>84</b> |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | <b>94</b> |
| <b>7</b>   | <b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....   | <b>95</b> |
| <b>8</b>   | <b>PRODUÇÕES CIENTÍFICAS NO PERÍODO</b> .....   | <b>96</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>97</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A ampla e geograficamente democrática disponibilidade de biomassas lignocelulósicas tem direcionado seu uso como matérias-primas em diversos setores industriais. No caso particular do Brasil, a cana-de-açúcar é extensamente utilizada para a produção de etanol e açúcar, o que implica na geração de quantidades significativas de bagaço e palha durante seu processamento e impulsiona o desenvolvimento de processos inseridos nas chamadas *biorrefinarias integradas*, que buscam otimizar o uso de celulose, hemicelulose e lignina para a produção de compostos de maior valor agregado.

A utilização de biomassas lignocelulósicas em bioprocessos requer a desconstrução de suas paredes celulares vegetais e a solubilização de seus monômeros constituintes para a utilização de suas frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose) e polifenólica (lignina). Diferentes procedimentos de desconstrução podem ser empregados dependendo da fração de interesse. No caso da fração hemicelulósica, a hidrólise ácida diluída tem sido amplamente utilizada para a obtenção de hidrolisados ricos em pentoses, como a xilose. Estes hidrolisados, por sua vez, têm sido empregados na produção biotecnológica de xilitol, polioliol comercialmente produzido por rota química amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, odontológica, farmacêutica e de cosméticos, bem como na síntese orgânica de moléculas para fins diversos e no desenvolvimento de novos materiais. Contudo, embora a hidrólise ácida diluída se mostre eficiente para a obtenção de hidrolisados ricos em açúcares, ela também acarreta na formação/liberação de compostos tóxicos aos microrganismos, os quais inibem o metabolismo microbiano e reduzem a produção do bioproduto de interesse. Os principais inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos são compostos fenólicos, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural e íons metálicos, sendo seus efeitos inibitórios dependentes de suas concentrações, efeitos individuais e efeitos sinérgicos.

Devido a isso, diferentes procedimentos de destoxificação são empregados para a redução, total ou parcial, desses inibidores, visando o favorecimento do metabolismo microbiano e a produção do bioproduto de interesse. Contudo, em muitos casos, estes procedimentos possuem custos elevados para os bioprocessos, geram resíduos e reduzem os níveis de açúcares dos hidrolisados, comprometendo assim a bioconversão do substrato ao produto de interesse. Estratégias de adaptação celular são vistas como uma alternativa

aos procedimentos de destoxificação, uma vez que a pré-exposição dos microrganismos aos inibidores permite o desenvolvimento de linhagens robustas e mais tolerantes aos inibidores de origem lignocelulósica. Estas estratégias também podem ser empregadas em complemento aos procedimentos de destoxificação.

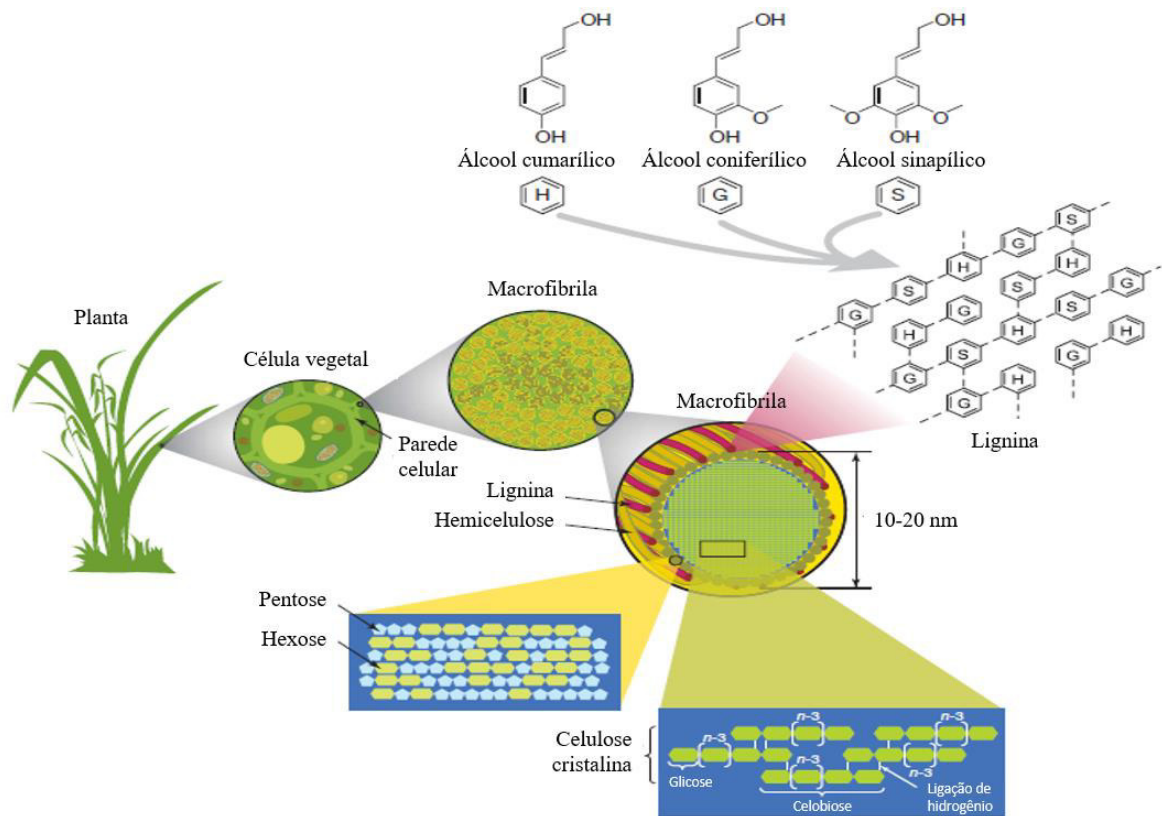
Considerando a existência de gargalos a serem contornados para que a produção biotecnológica de xilitol atinja níveis industriais de forma competitiva à rota química, como a toxicidade dos hidrolisados hemicelulósicos, este trabalho teve como objetivo avaliar a adaptação de *Candida tropicalis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana, de forma complementar à destoxificação do hidrolisado, como estratégia para aumentar a tolerância da levedura aos inibidores presentes no hidrolisado e elevar a produção de xilitol. Propõe-se, ainda a avaliação dos efeitos do hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana sob o metabolismo e a fisiologia de *C. tropicalis*. Desta forma, espera-se contribuir para o desenvolvimento da produção biotecnológica de xilitol a partir do bagaço e palha de cana de forma integrada ao setor sucroenergético.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biomassas lignocelulósicas

Biomassas lignocelulósicas são constituídas por uma associação de macromoléculas orgânicas contendo átomos de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo e enxofre e pequenas quantidades de sais de metais alcalinos, alcalinos-terrosos e pesados. Celulose, hemicelulose e lignina, componentes principais das paredes celulares vegetais (Figura 1), predominam em relação aos demais compostos de baixa massa molar (Strassberger et al., 2014).



**Figura 1.** Composição da parede celular de biomassa lignocelulósicas em termos de seus constituintes principais: celulose, hemiceluloses e lignina. Adaptado de Rubin (2008).

A celulose é um polissacarídeo linear de alta massa molar e insolúvel em água, constituído por resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), sendo cada cadeia deste homopolissacarídeo constituída por até 25.000 resíduos de glicose (Juturu e Wu, 2014; Klinke et al., 2004; Menon e Rao, 2012). A formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose leva à formação de microfibrilas (junção de 15-45 cadeias de celulose) e de microfibrilas/fibras (grupamento de microfibrilas), mantendo a

celulose no seu estado nativo (forma paracristalina), com regiões cristalinas e amorfas (Juturu e Wu, 2014).

As hemiceluloses, por sua vez, são heteropolissacarídeos ramificados, amorfos e diversos, cuja estrutura varia entre as diferentes espécies vegetais. Possuem um esqueleto glicídico central composto por resíduos de glicose, manose e/ou xilose unidos por ligações glicosídicas com uma configuração equatorial dos átomos C1 e C4 e podendo ser classificadas em glucanas, xilanas, mananas e glucomananas (Scheller e Ulvskov, 2010). Ramificados à cadeia principal podem ser encontrados diferentes resíduos de açúcares, como D-galactose, D-xilose, L-arabinose, L-fucose e L-ranmose e ácidos, como D-glucurônico, D-galacturônico e acético (Arcaño et al., 2020; Menon e Rao, 2012; Scheller e Ulvskov, 2010). Algumas hemiceluloses, como as xilanas, possuem ainda compostos fenólicos ramificados em sua constituição, como os ácidos ferúlico e *p*-cumárico esterificados nos resíduos arabinofuranosil. Dependendo de suas ramificações, as hemiceluloses são classificadas em xiloglucanas, glucoronoarabinoxilanas, glucoronoxilanas, galactomananas, galactoglucomananas e outras (Scheller e Ulvskov, 2010).

A lignina é uma macromolécula amorfa, hidrofóbica e complexa, formada pela polimerização de três componentes aromáticos principais, os álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico, que são inseridos na estrutura da lignina a partir de três unidades básicas, *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente, por meio de ligações éter e carbono-carbono, como as ligações  $\alpha$  e  $\beta$ -arilalquil,  $\beta$ -O-4, 5-5,  $\beta$ -5 e dibenzodioxina (Menon e Rao, 2012; Strassberger et al., 2014). A proporção H/G/S na lignina varia entre as espécies vegetais, estando presente em cerca de (%): 2-18/82-98/traços em madeiras coníferas, 0/22-66/44-86 em madeiras de lei e 5-26/27-54/23-67 em gramíneas (Klinke et al., 2004).

A composição das biomassas lignocelulósicas em termos destes três constituintes principais também varia de acordo com a espécie. Klinke et al. (2004) descreveram a presença de celulose, hemiceluloses e lignina em madeiras coníferas na faixa de 41-50 %, 11-33 % e 19-30 %, respectivamente. Para madeiras de lei, estes autores relataram a presença de 39-53 % de celulose, 19-36 % de hemiceluloses e 17-24 % de lignina, enquanto para as gramíneas estes polímeros são encontrados nas faixas de 24-50 %, 12-38 % e 6-29 %, respectivamente.

Em complemento aos principais constituintes da parede celular vegetal, biomassas lignocelulósicas também possuem em sua composição constituintes extrativos e não-extrativos. Extrativos, também chamados de metabólitos secundários, tais como terpenos, fenóis, quinonas e taninos, podem ser extraídos com água ou solventes orgânicos, e possuem a função de fornecer proteção biológica e antimicrobiana à planta (Klinke et al., 2004). Os componentes não-extrativos, por sua vez, são compostos inorgânicos, como sílica e sais, ou orgânicos, como pectina, proteínas e amido (Klinke et al., 2004).

As mudanças climáticas observadas nas últimas décadas, bem como a redução na disponibilidade de recursos fósseis e o aumento da poluição ambiental, têm motivado a busca por formas sustentáveis e renováveis de produção e consumo. O conceito de bioeconomia surgiu como uma alternativa à dependência de produtos obtidos a partir de fontes fósseis, baseando-se na utilização de recursos biológicos renováveis e sustentáveis para a obtenção de energia, insumos químicos e materiais (McCormick e Kautto, 2013). No contexto das biorrefinarias, a aplicação de biomassas lignocelulósicas tem ganhado notoriedade na comunidade científica nas últimas décadas (Lago et al., 2012). Uma ampla gama de processos podem ser empregados nestas instalações para a separação dos constituintes principais dessas biomassas, os quais podem ser então convertidos por processos bioquímicos e/ou termoquímicos em bioenergia (elétrica, térmica, biocombustíveis de primeira, segunda e terceira geração), insumos químicos, materiais e biomoléculas de maior valor agregado (Bozell, 2008; Lago et al., 2012; Menon e Rao, 2012).

Diferentes estudos utilizam biomassas lignocelulósicas para a produção de bioenergia, sendo a cana-de-açúcar considerada uma das fontes de carbono mais competitivas devido à sua alta eficiência na geração de biomassa (Lago et al., 2012; Moraes et al., 2018). Visando a maximização da produção de bioprodutos, as biorrefinarias devem ser projetadas para a utilização de todo o carbono disponível na matéria-prima, o que, aliado às operações agroindustriais do setor sucroenergético, contribui para ampliar e diversificar o portfólio de produtos do setor e valorizar a matéria-prima empregada (Hernández-Pérez, 2019; Lago et al., 2012). Este cenário também contribui para a redução da dependência de fontes de energia não renováveis, diversificação da matriz energética e atribuição de uma maior autonomia energética para a agroindústria de cana-de-açúcar (Bozell, 2008; Menon e Rao, 2012).

## 2.2 Bagaço e palha de cana-de-açúcar

Com uma produção mundial de aproximadamente 1,87 bilhão de toneladas em 2020, a cultura de cana-de-açúcar vem ocupando posição de destaque no cenário agrícola mundial. O Brasil é, atualmente, a terceira maior potência agrícola mundial e o principal produtor deste cultivar (FAO, 2020, 2018; OECD-FAO, 2018). Segundo a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO), em 2020 o Brasil produziu aproximadamente 757 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, o que corresponde a aproximadamente 40,5 % de toda a produção mundial (FAO, 2020). Estima-se que, para a safra de 2021/22, a produção brasileira de cana-de-açúcar atinja aproximadamente 568,4 milhões de toneladas em uma área cultivada superior a 8 mil hectares, sendo a região sudeste a principal produtora do país e o estado de São Paulo responsável por cerca de 50,6 % de toda a produção nacional (CONAB, 2021).

A cana-de-açúcar produzida no país é processada no setor sucroenergético para a produção de etanol e açúcar. Para a safra de 2021/22, estima-se uma produção de aproximadamente 24,8 bilhões de litros de etanol e 33,9 milhões de toneladas de açúcar (CONAB, 2021). Durante o processamento da cana, os subprodutos lignocelulósicos bagaço e palha são gerados nos processos de moenda e colheita mecanizada, respectivamente, sendo responsáveis por cerca de dois terços do conteúdo energético da cana e aproximadamente 28 % de seu peso, em massa seca colhida (CONAB, 2021; Pippo et al., 2011). Considerando a produção de cana-de-açúcar estimada para a safra de 2021/22, a geração destes subprodutos durante o processamento da cana pode alcançar a faixa de 159 milhões de toneladas.

A principal aplicação do bagaço de cana consiste na cogeração de energia elétrica e térmica via incineração em caldeiras, processo que não só permite a autossuficiência energética das usinas, mas gera um excedente de eletricidade que pode ser comercializado (Carvalho et al., 2017). Além disso, o bagaço também é empregado como matéria-prima na produção de etanol de segunda geração, na alimentação animal e na produção de papel (Costa e Bocchi, 2012; Menon e Rao, 2012). A palha de cana, por sua vez, que corresponde às pontas e às folhas secas e verdes da planta, é frequentemente deixada sobre a superfície do solo após a colheita, conferindo inúmeros benefícios a este, como proteção contra erosão e impacto de gotas de chuva, manutenção da umidade, regulação da temperatura, aumento da disponibilidade de carbono orgânico e auxílio na ciclagem de

nutrientes (Varanda et al., 2019). Em algumas usinas, parte da palha também é empregada no processo de cogeração de energia elétrica (Carvalho et al., 2017).

Por outro lado, as grandes quantidades de bagaço e palha de cana geradas abrem precedentes para a incorporação destes subprodutos como matérias-primas para a produção de insumos químicos e materiais de alto valor agregado no contexto das biorrefinarias (Lago et al., 2012). Segundo Rocha et al. (2012), devido à modernização das caldeiras e à racionalização e otimização do uso do vapor, cerca de 50 % do bagaço gerado seria capaz de satisfazer as necessidades energéticas das usinas. Além disso, o aumento da disponibilidade da palha pela inserção da colheita mecanizada da cana em 2002 torna necessária a busca por aplicações alternativas para este subproduto, uma vez que sua disposição em excesso sobre o campo pode aumentar a emissão de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) e o risco de incidência de pragas e incêndios naturais (Carvalho et al., 2017; Varanda et al., 2019). Segundo Carvalho et al. (2017), a manutenção de 7 toneladas de palha seca por hectare de solo é capaz de preservar os benefícios agrônômicos correspondentes, permitindo a utilização do excedente em outras aplicações.

Além da ampla disponibilidade do bagaço e da palha de cana, a presença de compostos orgânicos como açúcares e fenólicos, também fornece suporte para a aplicação destas biomassas em biorrefinarias (Lago et al., 2012; Strassberger et al., 2014). Em termos de seus constituintes principais, o bagaço possui cerca de 40-45 % de celulose, 30-35 % de hemiceluloses e 20-30 % de lignina (Bezerra e Ragauskas, 2016), enquanto a palha é constituída por 29-44 % de celulose, 27-31 % de hemiceluloses e 19-34,4 % de lignina (Carvalho et al., 2017).

### **2.3 Xilitol**

O xilitol (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>, 152,15 g·mol<sup>-1</sup>) é um composto pertencente a classe dos polióis, também conhecidos como açúcares-álcool, naturalmente produzido pelo metabolismo de plantas, mamíferos e microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Mussatto, 2012). Devido às suas propriedades, é atualmente um importante insumo das indústrias de alimentos, farmacêutica, de cosméticos e de materiais odontológicos. Além disso, também pode ser empregado como uma plataforma química para a síntese de outras moléculas de interesse e materiais (Arcaño et al., 2020).

Em 1983, o xilitol foi classificado pelo *Joint Committee of Experts on Food Additives* (JECFA) como minimamente tóxico, não representando um risco à saúde de seres humanos (Arcaño et al., 2020). Devido a isto, recebeu o título GRAS (*Generally Recognized as Safe*), sendo reconhecido como seguro para consumo e uso como aditivo em alimentos em diferentes países, além de possuir inúmeros efeitos benéficos sob a saúde humana e aplicações na medicina e na indústria de cosméticos (Tabela 1). Em 2004 o xilitol foi classificado pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos como um dos 12 produtos químicos de alto valor agregado produzidos a partir de biomassas lignocelulósicas, cuja produção integrada em biorrefinarias poderia suportar sua viabilidade técnica e econômica (Werpy e Petersen, 2004).

Na indústria farmacêutica o xilitol é utilizado no mascaramento de sabores indesejáveis de alguns ativos farmacêuticos e excipientes, o que é possível devido ao processo endotérmico relacionado à sua dissolução ( $-34,8 \text{ cal g}^{-1}$ ), que provoca uma sensação de frescor quando dissolvido na boca (Arcaño et al., 2020). Também pode ser empregado como uma plataforma química para a síntese de novas moléculas com diversas aplicações (Hernández-Pérez et al., 2019). Pelo processo de hidrogenólise sob altas temperaturas e pressões, o xilitol pode ser convertido a etilenoglicol e propilenoglicol. Processos oxidativos também podem ser utilizados converter o xilitol à ácido xilárico e ácido xilônico. Já em processos de hidroxigenação, o xilitol pode ser utilizada para a produção de misturas de hidroxifuranos e oxigenatos de alta octanagem (Arcaño et al., 2020). Recentemente, diferentes pesquisas empregando xilitol têm sido realizadas no campo do desenvolvimento de novos materiais, como nanofolhas hexagonais de nitreto de boro e grafeno (Wang et al., 2020a), ambos com potencial de aplicação em materiais de controle térmico, tecidos retardantes de chamas (Wang et al., 2019), polímeros com memória de forma utilizados em tubos de polietileno termoencolhíveis para isolamento elétrico (Wong et al., 2020) e na formulação de polímeros, como poliuretanos, empregados na fabricação de espumas para colchões, assentos domésticos e automotivos, elastômeros, adesivos, revestimentos e selantes (Arcaño et al., 2020).

**Tabela 1.** Benefícios do xilitol sob a saúde humana e aplicações na medicina. (Arcaño et al., 2020; Benahmed et al., 2020; Hernández-Pérez et al., 2019; Korponyai et al., 2017; Mussatto, 2012); Umino et al., 2019)

| <b>Benefícios</b>                             | <b>Mecanismo de ação</b>  |
|---|---|
| Saúde oral                                    | Atua como agente anticariogênico, pois não é assimilado pela microbiota oral devido a sua alta estabilidade microbiológica. Inibe a formação de biofilme nos dentes, diminui o risco de candidíase na mucosa oral, estimula a remineralização dos dentes pela indução da formação de saliva rica em minerais e reduz a incidência de gengivite  |
| Cuidados com a pele                           | Proporciona umectação e hidratação à pele, melhora a função de barreira contra microrganismos patogênicos, estimula a produção de colágeno, proporciona ação antibacteriana e contribui com o aumento da espessura da pele  |
| Controle glicêmico e prevenção de obesidade   | Controla a glicemia pelo seu baixo índice glicêmico, é indicado para consumo por pessoas com diabetes <i>mellitus</i> tipo I ou II devido ao seu metabolismo independente de insulina, previne a obesidade em razão de seu conteúdo calórico inferior ao da sacarose, além de proporcionar um lento esvaziamento gástrico, aumentando a saciedade e prevenindo a sensação de fome e ingestão de alimentos |
| Tratamento de infecções do trato respiratório | Sua alta estabilidade microbiológica o torna um aliado no tratamento de sinusite, infecções bacterianas na nasofaringe e infecções pulmonares, como a pneumonia. Atua também na redução da carga bacteriana e no aumento dos mecanismos de defesa das vias respiratórias  |
| Metabolismo ósseo                             | Contribui para o aumento da densidade mineral dos ossos, previne a osteoporose pelo estímulo da absorção de cálcio no intestino e pela facilitação de sua passagem do sangue para os ossos. Atua na ativação dos processos de calcificação da cartilagem e de síntese de colágeno   |
| Estímulo da digestão                          | Possui propriedades prebióticas e previne doenças no cólon, pois ao ser consumido pela microbiota intestinal contribui para a redução do pH intestinal. Melhora a função de barreira contra microrganismos patogênicos e auxilia na manutenção da saúde intestinal  |
| Processos inflamatórios                       | Reduz reações inflamatórias pela inibição da expressão de citocinas inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeos. Inibe a invasão, migração e formação de tubos de células endoteliais da veia umbilical humana e atua na inibição da angiogênese, processo que ocorre na formação de tumores e metástase  |
| Outros  | Tratamento de anemia hemolítica, otite média e lesões renais e parenterais. Atenua a anorexia e o retardamento do crescimento   |

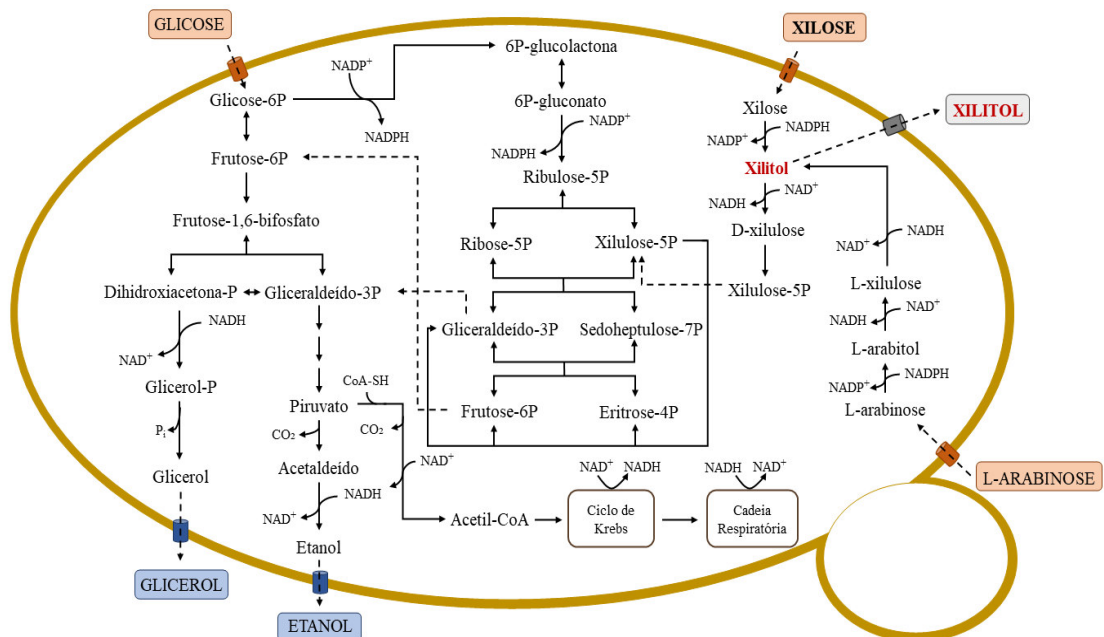
Como a produção de xilitol por plantas ocorre em baixas concentrações (até 1 g por 100 g de massa seca), o processo de extração a partir destas fontes não é considerado economicamente viável (Mussatto, 2012). Atualmente a produção de xilitol é realizada pela redução catalítica da xilose purificada a partir de hidrolisados hemicelulósicos empregando o catalisador níquel de Raney e condições severas de temperatura (140-200 °C) e pressão (50-60 bar) (Dasgupta et al., 2017). Embora esta rota de produção apresente alta eficiência de conversão, suas principais desvantagens estão associadas ao alto consumo de energia e à necessidade de extensivas etapas purificação da xilose, que tornam o processo oneroso, representando cerca de 80 % do custo de produção (Arcaño et al., 2020; Hernández-Pérez et al., 2019). Outras desvantagens incluem a utilização de equipamentos caros e especializados e a dificuldade de desativação e reciclagem dos catalisadores a partir da solução homogênea produzida (Dasgupta et al., 2017). A produção biotecnológica de xilitol via fermentação se mostra uma alternativa promissora, pois não requer a purificação da xilose, além de equipamentos caros e especializados, e não utiliza catalisadores químicos e condições severas, custosas e não amigáveis ao meio ambiente (Hernández-Pérez et al., 2019; Hou-Rui, 2012). Para a recuperação do xilitol a partir do meio fermentado, diferentes estratégias são propostas, como métodos cromatográficos, separação por membrana, adsorção em carvão ativado e cristalização, sendo a última descrita como um método eficaz para a obtenção do xilitol com altos índices de pureza (Hernández-Pérez et al., 2019; Martínez et al., 2015).

Leveduras são microrganismos que se sobressaem na produção biotecnológica de xilitol devido às suas altas taxas de assimilação de pentoses e altos rendimentos e produtividades de xilitol (Hernández-Pérez et al., 2019; Hou-Rui, 2012). O gênero *Candida* tem se destacado neste cenário pela sua alta eficiência de conversão de xilose em xilitol (aproximadamente 86 %) e produtividade consideravelmente alta (em torno de 0,63 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>). Fungos filamentosos e bactérias também produzem xilitol, mas os baixos rendimentos e produtividades impedem suas aplicações em larga escala (Dasgupta et al., 2017).

O metabolismo de xilose por leveduras (Figura 2) é iniciado pela ação de duas enzimas chaves: xilose redutase dependente de NAD(P)H (XR) e xilitol desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup> (XDH), que catalisam a redução da xilose a xilitol e a oxidação do xilitol à xilulose, respectivamente (Granström et al., 2007). A xilulose é então convertida a xilulose-5P, entrando na via das pentoses fosfato e, em seguida, no metabolismo do



carbono central, contribuindo para a regeneração do cofator NADPH, formação de intermediários metabólicos e geração de energia e biomassa celular (Granström et al., 2007). O acúmulo de xilitol pode ser alcançado pela limitação de oxigênio, fator que restringe a atividade da cadeia respiratória e a consequente regeneração do cofator  $\text{NAD}^+$ , levando a uma redução da taxa  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . A diminuição nos níveis deste cofator restringe a atividade da enzima XDH, levando ao acúmulo de xilitol que é então excretado pela célula (Hernández-Pérez et al., 2016b).



**Figura 2.** Metabolismo dos principais carboidratos presentes em hidrolisados hemicelulósicos por leveduras assimiladoras de pentoses. Baseado em Arruda (2011) e Bettiga et al. (2009).

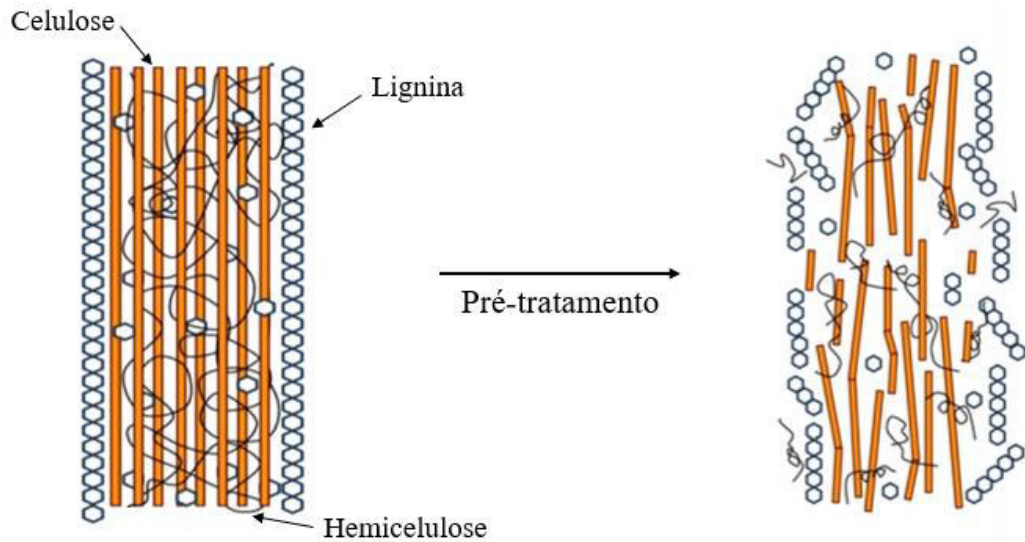
A produção biotecnológica de xilitol vem sendo realizada a partir de biomassas lignocelulósicas com altos teores de xilose em sua fração hemicelulósica, principalmente subprodutos agroindustriais. Diferentes pesquisas empregam a levedura *Candida guilliermondii* neste contexto, como realizado em frascos Erlenmeyer empregando o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana com rendimento e produtividade volumétrica de xilitol de  $0,81 \text{ gg}^{-1}$  e  $0,60 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectivamente (Arruda et al., 2011) e ainda a ampliação da produção para reatores de 125 L com a manutenção dos resultados obtidos em frascos Erlenmeyer (Arruda et al., 2017). No caso da palha de cana, Hernández-Pérez et al. (2016b) observaram a produção de  $36,11 \text{ gL}^{-1}$  de xilitol quando este hidrolisado foi suplementado com  $10 \text{ gL}^{-1}$  de sacarose, obtendo uma produtividade volumétrica de  $0,75 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Já Hernández-Pérez et al. (2020) relataram uma produção de  $26,19 \text{ gL}^{-1}$  de xilitol por *C. guilliermondii* a partir do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha

de cana-de-açúcar suplementado com xarope de cana, obtendo uma produtividade volumétrica de  $0,55 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Moraes et al. (2018) relataram a produção de  $47,12 \text{ gL}^{-1}$  de xilitol por *C. guilliermondii* a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada suplementado com extrato de farelo de arroz, sulfato de amônio e cloreto de cálcio, obtendo uma produtividade volumétrica de  $0,69 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , enquanto López-Linares et al. (2018) observaram a obtenção de rendimento de xilitol de  $0,55$  e  $0,45 \text{ gg}^{-1}$  e produtividade volumétrica de  $0,42$  e  $0,12 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  para as leveduras *C. guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii*, respectivamente, a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de colza.

Ao longo das últimas décadas, a produção industrial global de xilitol aumentou cerca de 40 vezes, atingindo, em 2016, a marca de 190,9 mil toneladas e movimentando um mercado de aproximadamente US\$ 725,9 milhões (Arcaño et al., 2020; Moraes et al., 2018). Com um aumento de 21,7 %, em 2019 o mercado global de xilitol atingiu a marca de US\$ 883,5 milhões (Global Market Insights, 2019). Espera-se que, no período de 2020 a 2026, este mercado cresça a uma taxa CAGR (*Compound Annual Growth Rate*) de 2,8 %, atingindo uma produção de xilitol de mais de 266,5 mil toneladas em 2026 e um mercado superior a US\$ 1 bilhão (Arcaño et al., 2020; Global Market Insights, 2019).

## 2.4 Hidrolisados hemicelulósicos

A obtenção de hidrolisados a partir de biomassas vegetais é uma das etapas cruciais para o aproveitamento de suas frações constituintes. A lignina, uma macromolécula heterogênea, complexa e altamente hidrofóbica, (Puligundla et al., 2016), aliada à natureza cristalina da celulose e à ligação dos ésteres ferulato e cumarato entre as hemiceluloses e a lignina, conferem recalcitrância à parede celular vegetal, dificultando seu fracionamento (Juturu e Wu, 2014; Puligundla et al., 2016; Scheller e Ulvskov, 2010) e o acesso às porções polissacarídicas. O sucesso dos bioprocessos depende da desconstrução da parede vegetal, o que permite a despolimerização da lignocelulose, liberando seus monômeros constituintes a partir do rompimento de ligações covalentes e de interações intermoleculares entre as macromoléculas (Figura 3) (Puligundla et al., 2016).



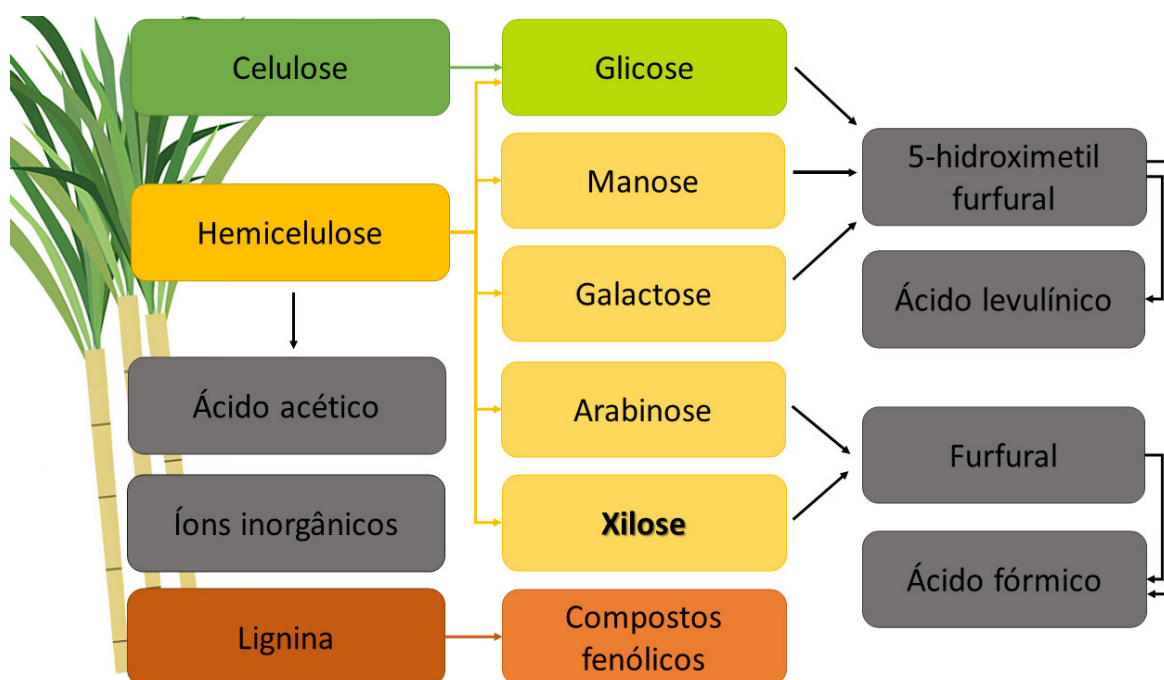
**Figura 3.** Desconstrução da parede celular vegetal de biomassas lignocelulósicas. Adaptado de Mood et al. (2013).

Para o aproveitamento da fração hemicelulósica, diferentes métodos de desconstrução da parede celular vegetal podem ser empregados, como extração com fluidos supercríticos, solventes orgânicos ou líquidos iônicos, explosão a vapor e pré-tratamento com água quente. A hidrólise ácida diluída é o método mais comumente aplicado, uma vez que combina eficácia, baixo custo, fácil operação e curtos tempos de reação (Arcaño et al., 2020). Diversos ácidos podem ser usados na hidrólise da hemicelulose, dentre ácidos inorgânicos, como ácido sulfúrico, trifluoroacético, clorídrico, nítrico e fosfórico, e ácidos orgânicos fracos, como ácido acético, maleico, succínico e cítrico (Arcaño et al., 2020). O ácido sulfúrico é o mais comumente utilizado pelo seu baixo custo e baixa volatilidade (Rao et al., 2016). Segundo Moraes et al. (2018), este ácido amolece a estrutura da biomassa pela quebra da proteção da lignina, reduz a cristalinidade da celulose e despolimeriza e solubiliza os açúcares constituintes das hemiceluloses. Este processo permite a recuperação de 70-95 % dos açúcares monoméricos presentes nas hemiceluloses em temperaturas relativamente moderadas (121-160 °C) e com a consequente formação da celulignina, fração sólida que pode ser posteriormente hidrolisada e destinada à produção de etanol (Arcaño et al., 2020; Moraes et al., 2018).

Arruda et al. (2011) e Hernández-Pérez et al. (2016a) empregaram a hidrólise ácida diluída com ácido sulfúrico para a hidrolisar a fração hemicelulósica do bagaço e da palha de cana, respectivamente, empregando proporção biomassa seca:solução ácida (1:10),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 % ( $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$ ) e 121 °C por 20 min. Os autores obtiveram hidrolisados hemicelulósicos contendo 1,82  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose, 15,73  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de xilose e 1,45  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de arabinose e 3,70  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose, 18,60  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de xilose e 3,90  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de arabinose, respectivamente. Hernández-Pérez

(2019), empregando as mesmas condições de hidrólise para a mistura de bagaço e palha de cana (1:1), obteve um hidrolisado hemicelulósico contendo  $1,44 \text{ gL}^{-1}$  de glicose,  $13,18 \text{ gL}^{-1}$  de xilose e  $2,63 \text{ gL}^{-1}$  de arabinose. A hidrólise ácida diluída com ácido sulfúrico também foi empregada para outras biomassas, como palha de cevada, sendo obtido ao final do processo um hidrolisado contendo  $20,92 \text{ gL}^{-1}$  de xilose,  $3,99 \text{ gL}^{-1}$  de glicose e  $0,94 \text{ gL}^{-1}$  de arabinose (Moraes et al., 2018) e palha de colza, obtendo-se um hidrolisado hemicelulósico com  $2,96 \text{ gL}^{-1}$  de glicose,  $10,30 \text{ gL}^{-1}$  de xilose,  $2,20 \text{ gL}^{-1}$  de galactose,  $1,72 \text{ gL}^{-1}$  de arabinose e  $0,66 \text{ gL}^{-1}$  de manose (López-Linares et al., 2018).

Além de solubilizar os monômeros constituintes da fração hemicelulósica, a hidrólise ácida diluída de biomassas lignocelulósicas acarreta também na formação e liberação de compostos que podem atuar como inibidores do crescimento microbiano e do processo fermentativo, reduzindo o rendimento e a produtividade do bioprocessamento (Silva-Fernandes et al., 2017). Estes inibidores podem ser classificados em furanos (furfural e 5-hidroxi-metilfurfural), ácidos alifáticos (ácido acético, fórmico e levulínico), compostos fenólicos e íons inorgânicos, sendo suas gerações dependentes da matéria-prima empregada e das condições de hidrólise (Figura 4) (Jönsson et al., 2013; Wang et al., 2015a).



**Figura 4.** Despolimerização e solubilização de açúcares e solubilização/formação de inibidores durante a hidrólise ácida diluída de biomassas lignocelulósicas. Baseado em Jönsson et al. (2013).

A formação de furanos durante a hidrólise ácida diluída decorre da utilização de elevadas temperaturas e pressões, condições que acarretam na desidratação de pentoses e

hexoses e consequente formação de furfural e 5-hidroxi-metilfurfural (5-HMF), respectivamente (Jönsson et al., 2013; Rao et al., 2016). Silva-Fernandes et al. (2017) relataram a presença de 0,41 e 1,08 gL<sup>-1</sup> de furfural e 5-HMF, respectivamente, no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana obtido por moagem artesanal, enquanto Arruda et al. (2011) relataram a presença de 0,19 e 0,02 gL<sup>-1</sup> de furfural e 5-HMF para o hidrolisado obtido a partir dessa mesma biomassa processada industrialmente. Hernández-Pérez et al. (2016a) relataram a presença de 0,33 e 0,57 gL<sup>-1</sup> destes furanos, respectivamente, no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana. Ao utilizar a mistura (1:1) das biomassas mencionadas, Hernández-Pérez (2019) relatou a obtenção de 0,24 gL<sup>-1</sup> de furfural e 0,07 gL<sup>-1</sup> de 5-HMF.

Na hidrólise ácida diluída, o ácido fórmico pode ainda ser gerado pela degradação termoquímica do furfural e do 5-HMF, enquanto o ácido levulínico é obtido pela degradação do 5-HMF. No caso do ácido acético, sua formação se dá pela desacetilação da hemicelulose (Jönsson et al., 2013). Jofre (2019) relatou a presença de 4,96 gL<sup>-1</sup> de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana (1:1), enquanto Hernández-Pérez (2019) encontrou, para esta mesma mistura, a presença de 2,02 gL<sup>-1</sup> deste ácido. No caso do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, Silva (2006) relatou a presença de 1,89 e 0,92 gL<sup>-1</sup> dos ácidos acético e fórmico, respectivamente, enquanto Arruda et al. (2011) relataram a presença a presença de 2,31 gL<sup>-1</sup> de ácido acético.

No caso de compostos fenólicos, sua geração ocorre a partir da degradação parcial da lignina e de extrativos (Jönsson et al., 2013). Estes compostos representam uma classe muito diversa de moléculas classificadas de acordo com seus grupos funcionais em aldeídos, cetonas, álcoois e ácidos (Liu, 2011). Arruda et al. (2011) e Silva-Fernandes et al. (2017) relataram, para o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, a presença de 5,48 e 3,37 gL<sup>-1</sup> de compostos fenólicos totais, respectivamente, enquanto Hernández-Pérez (2015) descreveu, para o hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, a presença de 3,00 gL<sup>-1</sup>. Já Hernández-Pérez (2019) e Jofre (2019) descreveram para o hidrolisado da mistura das duas biomassas a presença de 3,38 e 1,50 gL<sup>-1</sup> destes compostos, respectivamente.

Nos hidrolisados hemicelulósicos obtidos por hidrólise ácida diluída também estão presentes íons inorgânicos. Estes podem se originar da biomassa empregada, dos reagentes químicos utilizados e até mesmo da corrosão do reator de hidrólise, sendo os íons ferro, cromo, níquel e cobre os mais comumente presentes em hidrolisados hemicelulósicos (Jönsson et al., 2013; Mussatto e Roberto, 2004). Silva-Fernandes et al. (2017) relataram a presença dos íons ferro, cromo, níquel e zinco no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de

cana nas concentrações de 170,03, 34,32, 14,42 e 12,07 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto Rodrigues et al. (2001) identificaram a presença destes íons nas concentrações de 427,8, 386,5, 29,3 e 22,6 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente. No caso do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana (1:1), Hernández-Pérez (2019) relatou a presença dos íons ferro, cromo, níquel e zinco nas concentrações de 388,85, 87,55, 30,60 e 3,75 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### *2.4.1 Toxicidade de hidrolisados hemicelulósicos*

Os inibidores gerados durante a hidrólise ácida diluída de biomassas vegetais interferem no crescimento e na atividade fermentativa, impondo um desafio significativo na implementação de bioprocessos economicamente viáveis (Hou-Rui, 2012; Liu, 2011). Diferentes aspectos são considerados para a fundamentação da toxicidade dos hidrolisados hemicelulósicos às células microbianas, uma vez que a inibição microbiana depende de características como composição do hidrolisado e concentrações e efeitos individuais dos inibidores, além do efeito sinérgico existente entre eles, sendo este um potencializador da toxicidade dos inibidores (Jofre, 2019). O efeito inibitório sinérgico do ácido acético, furanos e compostos fenólicos sobre o crescimento microbiano é descrito por Klinke et al. (2004). Outras características também devem ser levadas em consideração para definir a toxicidade de hidrolisados, como o tipo de microrganismo, sua adaptação ao meio de cultivo e o modo do processo fermentativo empregado (Mussatto e Roberto, 2004). Segundo Klinke et al. (2004), microrganismos fermentadores de pentoses são geralmente mais inibidos por hidrolisados hemicelulósicos do que leveduras fermentadoras de hexoses. Desse modo, a fermentação da xilose presente nos hidrolisados hemicelulósicos é afetada pelos inibidores em uma maior proporção que a de hexoses (Nielsen et al., 2015).

A toxicidade do furfural e do 5-HMF aos microrganismos está associada à perturbação da integridade da membrana plasmática, à indução de danos no DNA e à inibição da síntese de RNA e proteínas (Quéméneur et al., 2012; Rao et al., 2016). Estes podem também induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais provocam disfunções celulares como agregação de mitocôndrias tubulares, fragmentação de vacúolos, perda de estrutura da actina e difusão de cromatina nuclear compactada (Almeida et al., 2009). Além disso, estes compostos inibem enzimas da via glicolítica, do ciclo do ácido tricarbóxico e de reações fermentativas, perturbando o metabolismo celular

e reduzindo as taxas de crescimento e rendimento celular (Quéméneur et al., 2012; Ran et al., 2014; Taherzadeh e Karimi, 2011). Enzimas inibidas pelo furfural incluem a hexoquinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, piruvato desidrogenase e álcool desidrogenase, enquanto o 5-HMF inibe enzimas, como piruvato desidrogenase, aldeído desidrogenase e álcool desidrogenase (Taherzadeh e Karimi, 2011). A presença destes inibidores também reduz os níveis de ATP e NAD(P)H pela inibição enzimática e pelo consumo de cofatores para reparação dos danos celulares (Taherzadeh e Karimi, 2011).

Ask et al. (2013) relataram a diminuição das taxas específicas de consumo de glicose e xilose e de produção de etanol, glicerol e acetato por *Saccharomyces cerevisiae* recombinante em fermentações anaeróbicas em meio semidefinido contendo glicose e xilose como fontes de carbono e 2,4 mmol de furfural e 5,7 mmol de 5-HMF por grama de massa seca de células. A presença destes inibidores ainda reduziu significativamente as concentrações de cofatores redox, indicando uma perturbação do equilíbrio redox das células, e a diminuição da capacidade anabólica e catabólica da levedura. Também com a levedura *Debaryomyces hansenii*, cultivada em meio definido contendo de 0,5 a 2,0 gL<sup>-1</sup> de furfural, foi verificada a diminuição da assimilação de xilose, glicose e arabinose (Duarte et al., 2005). Os autores também relataram o aumento da fase lag e a diminuição da velocidade específica de crescimento em função do aumento da concentração deste inibidor. Já para o 5-HMF, Sanchez e Bautista (1988) observaram a inibição do crescimento de *C. guilliermondii* em 30,3 e 61,7 % na presença de 1,5 e 2,0 gL<sup>-1</sup> de 5-HMF, respectivamente, em meio definido contendo glicose. Para *Amorphotheca resinae*, foi verificado um lento consumo de glicose quando cultivada em meio semidefinido contendo glicose e na presença de 1 gL<sup>-1</sup> de furfural ou 5-HMF, sendo o consumo desta hexose acelerado apenas quando os inibidores foram degradados em mais de 90 % de sua concentração inicial (Ran et al., 2014).

O efeito tóxico de ácidos alifáticos está associado às suas formas não dissociadas (Jönsson et al., 2013), que são lipossolúveis e possuem a capacidade de penetrar pela membrana plasmática das células por difusão facilitada (Mussatto e Roberto, 2004). No interior das células, estes se dissociam devido ao pH citoplasmático próximo da neutralidade, levando à acidificação do pH intracelular em um mecanismo conhecido como desacoplamento de ácido fraco, que acarreta na inativação de proteínas e inibição de processos metabólicos. Além disso, ácidos alifáticos também atuam na indução do estresse oxidativo e na perturbação da membrana plasmática (Guo e Olsson, 2014). O acúmulo intracelular do ânion liberado pode ainda afetar o turgor celular e interferir em funções



metabólicas essenciais (Mills et al., 2009). Concentrações elevadas de ácidos alifáticos podem ainda levar ao esgotamento de ATP, induzindo o microrganismo à morte celular (Giannattasio et al., 2013; Guo e Olsson, 2014; Jönsson et al., 2013).

Segundo Mills et al. (2009), ácido acético é o ácido encontrado em maiores concentrações em hidrolisados, variando de 1 a 10 gL<sup>-1</sup> dependendo da biomassa empregada. Matérias-primas contendo altos teores de xilana acetilada, como resíduos agroindustriais e madeiras de lei, fornecem maiores concentrações de ácido acético que outras biomassas (Jönsson et al., 2013). No caso do ácido fórmico, embora considerado mais tóxico devido ao seu menor tamanho, menor valor de pKa e maior difusibilidade pela parede celular, é encontrado em concentrações cerca de 10 vezes inferiores às do ácido acético. Outros ácidos alifáticos tóxicos gerados a partir da degradação de açúcares são encontrados em concentrações inferiores às do ácido fórmico, como o ácido levulínico, o qual apresenta maior efeito inibitório que o ácido acético devido à sua alta hidrofobicidade e facilidade de penetração na célula (Mills et al., 2009; Taherzadeh e Karimi, 2011).

A toxicidade do ácido acético em concentrações superiores a 3,0 gL<sup>-1</sup>, bem como o efeito benéfico sobre a produção de xilitol em concentrações inferiores a esta, foi relatada para *C. guilliermondii* cultivada em meio semidefinido contendo xilose (Felipe et al., 1995). Comportamento similar foi relatado para a produção de etanol por *S. cerevisiae* cultivada em meio semidefinido contendo glicose, em que houve aumento do rendimento de etanol em 20 % na presença de 3,3 gL<sup>-1</sup> de ácido acético (Taherzadeh et al., 1997). A inibição da atividade fermentativa de *C. guilliermondii* também foi relatada para o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana na presença de 5,0 gL<sup>-1</sup> deste ácido, sendo também constatado, nesta mesma condição, o favorecimento do metabolismo de xilose por meio do aumento das atividades das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase (Lima et al., 2004). No caso dos ácidos fórmico e levulínico, suas presenças de 95 a 220 mM e de 95 a 400 mM, respectivamente, levaram à inibição do crescimento de *S. cerevisiae* cultivada em meio semidefinido contendo glicose como fonte de carbono, o que foi evidenciado pelo aumento da fase lag de crescimento e pela diminuição da velocidade específica de crescimento. Observou-se também a diminuição do rendimento da produção de etanol na presença destes ácidos (Guo e Olsson, 2014).

O efeito inibitório dos compostos fenólicos, considerados como os principais inibidores de hidrolisados hemicelulósicos (Rao et al., 2016), parece estar associado às posições, quantidades e classes de grupos funcionais (Jönsson et al., 2013; Wang et al.,



2009; Adeboye et al., 2014). Tal inibição reduz a assimilação de açúcares e o crescimento celular, sendo os fenólicos de menor massa molar mais tóxicos que os de alta massa molar (Klinke et al., 2004; Mussatto e Roberto, 2004). Esta maior toxicidade decorre da maior facilidade de penetração na célula pela membrana plasmática (Klinke et al., 2004). A toxicidade de compostos fenólicos está associada a perda de integridade da membrana plasmática com consequente interferência na atividade biológica de proteínas e enzimas, no aumento da permeabilidade a íons, na perda de compostos intracelulares e na dificuldade de transporte de substratos (Mussatto e Roberto, 2004; Sikkema et al., 1995). Estes compostos também alteram a proporção proteína-lípido da membrana plasmática, induzem a formação de espécies reativas de oxigênio, desestabilizam o equilíbrio osmótico da mitocôndria pelo aumento do influxo de prótons, dissipando a energia proveniente dos açúcares na forma de calor, e interferem nas funções biológicas de enzimas e sistemas transportadores, por meio de interações hidrofóbicas com estas proteínas (Guo e Olsson, 2014; Jönsson et al., 2013; Sikkema et al., 1995).

A presença de compostos fenólicos interfere na fermentação alcoólica de hidrolisados por *S. cerevisiae*, reduzindo a produtividade de etanol (Adeboye et al., 2014). Para *C. guilliermondii* cultivada em meio semidefinido contendo xilose e na presença de 0,5 a 2,0 gL<sup>-1</sup> de siringaldeído, foi observado o aumento da fase lag e a diminuição da velocidade específica de crescimento, além da redução da produção de xilitol (Kelly et al., 2008). Os autores constataram ainda que o aumento das concentrações dos inibidores aumentou a severidade da inibição. A inibição do crescimento de *C. guilliermondii* pelos compostos fenólicos também foi relatada por Pereira et al. (2011) em cultivo em meio semidefinido contendo xilose e glicose e na presença de 0,6 gL<sup>-1</sup> de ácido ferúlico, sendo observada uma inibição de 30 % no crescimento da levedura. Para *S. cerevisiae* cultivada em meio semidefinido contendo glicose, 0,17 mM de ácido cinâmico reduziu a produção de biomassa em 50 % (Guo et al., 2018). Já aldeído coniferílico (1,1 mM) e ácido ferúlico (1,8 mM) inibiram o rendimento de biomassa de *S. cerevisiae* cultivada em meio semidefinido contendo glicose em 73 e 54 %, respectivamente (Adeboye et al., 2015). No caso de *Pichia stipitis*, cultivada em meio semidefinido contendo glicose, a presença de 0,2 gL<sup>-1</sup> de ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico reduziu o consumo de glicose em 41,7 e 47,4 %, respectivamente, e inibiu a produção de etanol pela levedura (Wang et al., 2017a).

A toxicidade de compostos inorgânicos, como íons e sais, está relacionada à inibição de enzimas e do metabolismo e à formação de compostos citotóxicos inespecíficos (Mudhoo e Kumar, 2013). Além disso, estes compostos em altas concentrações aumentam

a pressão osmótica, acarretando na inibição por estresse osmótico (Taherzadeh e Karimi, 2011). *Pachysolen tannophilus* cultivada em meio semidefinido contendo xilose e  $0,01 \text{ gL}^{-1}$  de níquel, cromo e cobre, exibiu uma inibição do crescimento celular e da produção de etanol em 86,8, 100 e 10,8 % e 53,8, 94,7 e 30,6 %, respectivamente (Watson et al., 1984). Segundo estes autores, o efeito tóxico de compostos inorgânicos em hidrolisados pode ser reduzido, quando comparado ao meio sintético, devido à presença de compostos orgânicos. Deste modo, hidrolisados podem fornecer um certo grau de proteção aos microrganismos contra a toxicidade de compostos inorgânicos. No caso de *S. cerevisiae*, cultivada em meio semidefinido contendo glicose,  $200 \mu\text{M}$  de cobre reduziu a de viabilidade celular da levedura em cerca de 99 % após 60 min de exposição, enquanto para o chumbo nesta mesma concentração, esta redução ocorreu após 48 h. A presença de  $200 \mu\text{M}$  de níquel não diminuiu a viabilidade celular após 48 h (Soares et al., 2003). Segundo os autores, o tempo letal para a perda de 50 % da viabilidade celular foi de 2,3 min, 4,2 h e > 48 h na presença de cobre, chumbo e níquel, respectivamente.

Como descrito anteriormente, o estabelecimento da toxicidade de hidrolisados não é baseado apenas no efeito individual dos inibidores, mas também no sinergismo entre eles. O prolongamento do ciclo celular na fase lag, bem como a diminuição da velocidade específica de crescimento, foram relatados para *C. tropicalis* cultivada na presença de  $1,19 \text{ gL}^{-1}$  de ácido acético,  $0,74 \text{ gL}^{-1}$  de furfural e  $0,92 \text{ gL}^{-1}$  de fenol em meio semidefinido contendo xilose (Wang et al., 2015a). A presença dos inibidores reduziu o consumo de xilose, a formação de biomassa e a produção de xilitol pela levedura. O sinergismo entre inibidores de origem lignocelulósica também foi observado para *Spathaspora passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis* cultivadas em meio semidefinido contendo glicose e xilose e na presença de ácido acético ( $4,5 \text{ gL}^{-1}$ ), furfural ( $0,5 \text{ gL}^{-1}$ ), 5-HMF ( $0,5 \text{ gL}^{-1}$ ) e vanilina ( $0,3 \text{ gL}^{-1}$ ) (Soares et al., 2020). Neste trabalho, a presença conjunta destes inibidores acentuou a inibição do consumo de glicose e xilose e da produção de etanol e biomassa pelas leveduras. Gu et al. (2019) avaliaram o efeito sinérgico dos ácidos vanílico, 4-hidroxibenzoico e sirínico sob *S. cerevisiae* em meio semidefinido contendo glicose. Segundo os autores, a mistura dos três inibidores aumentou a inibição do crescimento da levedura, bem como do consumo de glicose e do rendimento e produtividade de etanol, sendo a inibição agravada com o aumento das concentrações dos inibidores.

Apesar da influência negativa de compostos inibitórios à atividade fermentativa, o aproveitamento de hidrolisados lignocelulósicos em bioprocessos se mostra de

fundamental importância no contexto de biorrefinarias de cana-de-açúcar, permitindo agregar valor ao setor sucroalcooleiro por meio da produção de biomoléculas diversas, como o xilitol (Hernández-Pérez et al., 2019).

#### 2.4.2 Alterações metabólicas induzidas por inibidores presentes em hidrolisados

Além de induzir efeitos citotóxicos à fisiologia microbiana, os quais afetam negativamente o crescimento e o desenvolvimento celular, bem como a formação do bioproduto de interesse, os inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos também induzem alterações no metabolismo celular pela mudança de fluxos metabólicos e das concentrações de diferentes metabólitos intracelulares e extracelulares.

Ask et al. (2013) observaram que a presença de 2,4 mmol de furfural e 5,7 mmol de 5-HMF por grama de massa seca de células reduziu a concentração de piruvato e aumentou a produção de succinato por *S. cerevisiae* recombinante durante cultivo anaeróbico em meio semidefinido contendo xilose e glicose. Já Wang et al. (2015a), ao analisarem o efeito sinérgico do ácido acético ( $1,19 \text{ gL}^{-1}$ ), furfural ( $0,74 \text{ gL}^{-1}$ ) e fenol ( $0,92 \text{ gL}^{-1}$ ) sob *C. tropicalis* cultivada em meio semidefinido contendo xilose, observaram a redução da concentração de xilulose, sugerindo o aumento da taxa de consumo deste metabólito, bem como do fluxo metabólico através da via das pentoses fosfato na presença dos inibidores. Os autores constataram ainda o aumento de 3,25 e 2,09 vezes na produção de citrato e succinato, respectivamente, indicando a perturbação do fluxo metabólico no ciclo do ácido tricarbóxico. Guo et al. (2018), por sua vez, relataram o acúmulo de acetil-CoA em função das altas taxas de consumo de glicose e das taxas extremamente baixas de respiração por *S. cerevisiae* sob estresse dos ácidos acético, fórmico, levulínico e cinâmico.

O acúmulo de compostos de reserva, como a trealose, é frequentemente observado frente à toxicidade de inibidores. Este dissacarídeo é um metabólito intracelular descrito como protetor em situações de estresse causado, por alta osmolaridade, depleção de nutrientes, altas e baixas temperaturas e elevadas concentrações de etanol, por exemplo. A trealose possui papel protetor da membrana plasmática contra danos oxidativos e choque térmico, e previne o mal dobramento e a agregação de proteínas (Guo e Olsson, 2014; van Dijk et al., 2019). Quando cultivada em meio semidefinido contendo glicose e na presença dos ácidos acético, fórmico, levulínico e vanílico, *S. cerevisiae* apresentou um aumento na produção de trealose quando comparada com a ausência destes inibidores (Guo e Olsson,

2014). Segundo os autores, o acúmulo de trealose pode ser uma resposta ao estresse oxidativo e à perturbação da membrana plasmática induzidos pelos inibidores. Wang et al. (2015a) observaram o aumento de 2,22 vezes na produção de trealose durante a fase exponencial de crescimento de *C. tropicalis* cultivada na presença de 1,19 gL<sup>-1</sup> de ácido acético, 0,92 gL<sup>-1</sup> de fenol e 0,74 gL<sup>-1</sup> de furfural em meio semidefinido contendo xilose e glicose. Os autores relacionaram o aumento da produção do dissacarídeo à proteção da membrana plasmática, estabilização de proteínas e supressão da agregação de proteínas desnaturadas. Ainda, segundo os mesmos autores, a produção de trealose no início da fase estacionária não apresentou diferenças significativas, indicando que a produção e o metabolismo de trealose diminuem com a degradação dos inibidores presentes no meio.

A presença de inibidores altera também o metabolismo de lipídeos pela indução do remodelamento do conteúdo lipídico da célula (Guo et al., 2018; Lindberg et al., 2013). Microrganismos direcionam o fluxo de carbono para a produção de ácidos graxos saturados para aumentar a rigidez da membrana plasmática, contribuindo para a manutenção da integridade e diminuição da fluidez (Li et al., 2012a). Os ácidos graxos mais abundantes em leveduras são os ácidos insaturados oleico e palmitoleico (Guo et al., 2018). Em *C. tropicalis* cultivada na presença de 1,19 gL<sup>-1</sup> de ácido acético, 0,92 gL<sup>-1</sup> de fenol e 0,74 gL<sup>-1</sup> de furfural em meio semidefinido contendo xilose, observou-se o aumento da produção dos ácidos graxos saturados palmítico e octadecanóico (Wang et al., 2015a). Para *S. cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailli* cultivadas em meio semidefinido contendo glicose, a análise do perfil lipidômico revelou o aumento a produção de esfingolipídeos saturados por *S. cerevisiae* na presença de 9 gL<sup>-1</sup> de ácido acético. Para *Z. bailli* foi verificado o aumento do conteúdo de esfingolipídeos e glicerofosfolipídeos saturados na presença de 24 gL<sup>-1</sup> deste ácido (Lindberg et al., 2013).

Guo et al. (2018) observaram o aumento no conteúdo de ácidos graxos de cadeia muito longa por *S. cerevisiae* submetida ao estresse ácido por ácidos fracos. Segundo os autores, estes ácidos graxos são precursores na biossíntese de esfingolipídeos e seu acúmulo pode estar associado ao aumento do conteúdo de esfingolipídeos em células de *S. cerevisiae* estressadas. Guo et al. (2018) observaram ainda a redução do conteúdo de cardiolipina, lipídeo importante na manutenção do potencial e da arquitetura da membrana plasmática e no suporte de proteínas da membrana mitocondrial, por *S. cerevisiae* cultivada na presença dos ácidos levulínico e cinâmico, sendo isso associado à peroxidação da cardiolipina por espécies reativas de oxigênio produzidas devido ao estresse ácido, levando

à disfunção da mitocôndria e à dramática diminuição da taxa de respiração celular. Os autores também observaram a diminuição de ácido fosfatídico e o acúmulo de ergosterol pela levedura. Segundo eles, a diminuição dos níveis de ergosterol pela repressão e *knocking-down* da enzima esqualeno epoxidase aumentou a sensibilidade de *S. cerevisiae* aos ácidos acético, fórmico, levulínico e cinâmico, resultando em uma rápida perda de viabilidade celular. Desse modo, células com um maior conteúdo de ergosterol se mostraram mais resistentes ao estresse ácido. Ainda segundo os mesmos autores, células expostas ao ácido cinâmico possuíram um aumento em torno de 90 e 2 % no conteúdo dos ácidos graxos saturados octadecanóico e lignocérico, respectivamente, e uma redução de 55 % dos níveis do ácido graxo insaturado palmitoleico. O menor grau de insaturação do conteúdo lipídico da célula auxiliou a sobrevivência e o crescimento de *S. cerevisiae* frente a presença de ácido cinâmico no meio. No caso dos ácidos acético, fórmico e levulínico, o aumento do grau de insaturação do conteúdo lipídico da célula possuiu um efeito benéfico sobre o crescimento e sobre a taxa de sobrevivência de *S. cerevisiae*.

A presença de inibidores em hidrolisados lignocelulósicos pode afetar ainda as concentrações intracelulares de diferentes aminoácidos, como verificado para *C. tropicalis* cultivada na presença de ácido acético, fenol e furfural em meio semidefinido contendo xilose. Neste caso, constatou-se a diminuição dos níveis de aspartato, asparagina, lisina e metionina e o aumento drástico das concentrações de alanina, glicina, isoleucina, leucina e treonina (Wang et al., 2015a). Estudos análogos envolvendo a observação do crescimento de *Escherichia coli* na presença de ácidos fracos relataram a redução significativa das concentrações de glutamato e aspartato e, em menores níveis, de lisina, arginina, glutamina e metionina (Mills et al., 2009). O estresse provocado pelos inibidores pode induzir os microrganismos a regular vias metabólicas de biossíntese de aminoácidos específicos em detrimento de outras. Além disso, elevadas concentrações de alguns aminoácidos podem ocorrer pela indução da degradação de proteínas não funcionais geradas pelos inibidores ou pelo aumento da produção de aminoácidos importantes para a biossíntese de proteínas associadas à sobrevivência das células (Ding et al., 2012; Wang et al., 2015a).

A restauração de cofatores enzimáticos também é afetada pelos inibidores de origem lignocelulósica (Wang et al., 2015a). Guo e Olsson (2014) observaram o aumento da velocidade específica de produção de glicerol por *S. cerevisiae* exposta aos ácidos acético, fórmico e levulínico em resposta à necessidade de regeneração do cofator NAD<sup>+</sup>. Wang et al. (2015a) relataram o aumento de 1,66 vezes nos níveis de 1,3-propanediol para *C. tropicalis* cultivada na presença de ácido acético, furfural e fenol, o que pode estar

associado à regulação do balanço redox da célula e à necessidade de regeneração do cofator NAD<sup>+</sup>. Além de reações metabólicas, NAD<sup>+</sup> também é empregado em processos biológicos, como no reparo do DNA e na transdução de sinal. Assim, a regeneração deste cofator pode ser aumentada devido à necessidade do microrganismo frente ao estresse oxidativo causado pelos inibidores (Guo e Olsson, 2014).

#### 2.4.3 Mecanismos de tolerância aos inibidores presentes em hidrolisados

Alguns microrganismos possuem a capacidade de tolerar certas concentrações inibidores de origem lignocelulósica, sendo esta tolerância associada, em alguns casos, à capacidade do microrganismo de metabolizar os inibidores, em um processo conhecido como destoxificação *in situ* ou biodestoxificação (Liu, 2011; Ran et al., 2014). Segundo Rao et al. (2016), o grau de tolerância aos inibidores depende do microrganismo utilizado, bem como de seu nível de adaptação, do processo fermentativo empregado e da presença de outros inibidores no meio.

A tolerância ao furfural e ao 5-HMF se baseia na redução destes compostos, por reações de oxirredução acopladas aos cofatores NADH ou NADPH, a álcool furfurílico e 2,5-*bis*-hidroximetilfurano, respectivamente. Estas reações são catalisadas por enzimas com atividade aldeído redutase, como álcool desidrogenases, aldeído desidrogenases, aldo/ceto redutases, aldeído redutases e metilglioxal redutases. A conversão do grupamento aldeído a álcool reduz a toxicidade dos furanos, que podem ser posteriormente degradados em ácidos orgânicos, indicando que o grupamento aldeído é a parte tóxica da molécula, uma vez que diversos compostos que possuem o anel furânico em sua estrutura não são tóxicos a leveduras (Liu, 2011). Furfural e 5-HMF também podem ser convertidos aos seus derivados ácidos de menor toxicidade, ácido furóico e 5-hidroximetilfuróico, respectivamente, por reações de oxidação (Taherzadeh e Karimi, 2011). Em pesquisas com *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, aldo/ceto redutases estão envolvidas na biotransformação de furfural e 5-HMF aos seus derivados álcoois (Zhang et al., 2012), enquanto para *S. cerevisiae*, álcool desidrogenases, aldeído desidrogenases e metilglioxal atuam neste processo (Liu, 2011). Segundo Liu et al. (2009), leveduras tolerantes a estes furanos direcionam o fluxo de carbono a partir da glicose para a via das pentoses fosfato para a formação de NADPH, mantendo assim o equilíbrio redox da célula e permitindo a destoxificação *in situ* destes compostos. Além de realizar a conversão de furanos, estas

enzimas também catalisam a destoxificação de compostos fenólicos que possuem grupamentos aldeídos em sua estrutura, como cinamaldeído e vanilina (Liu, 2011).

Estudos demonstram ainda o papel do oxigênio na degradação de furfural e 5-HMF. *A. resinae* cultivada aerobicamente em meio semidefinido contendo 1 gL<sup>-1</sup> destes inibidores como única fonte de carbono apresentou um aumento da degradação de furfural a álcool furfurílico em comparação ao cultivo em anaerobiose. Mudanças significativas não foram observadas para a degradação do 5-HMF (Ran et al., 2014). Além de seus derivados álcoois, *A. resinae* também converteu estes furanos aos seus correspondentes ácidos em aerobiose. Esta conversão não foi observada para o cultivo em anaerobiose. Quando cultivada em aerobiose e na presença de glicose, a degradação dos furanos foi acelerada, enquanto em anaerobiose a degradação foi inibida. Segundo Taherzadeh e Karimi (2011), o ácido furóico é formado apenas em condições aeróbicas, enquanto o álcool furfurílico pode ser formado tanto em aerobiose, quanto em anaerobiose. No caso do 5-HMF, sua conversão se dá principalmente em 2,5-bis-hidroximetilfurano, havendo uma baixa conversão (cerca de 4 %) ao seu derivado ácido. Para *C. acetobutylicum* cultivado em meio semidefinido contendo glicose e suplementado com até 3 gL<sup>-1</sup> de furfural ou 5-HMF observou-se a conversão de furfural e 5-HMF a seus derivados álcoois com uma taxa específica de conversão de 2,13 gg<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e 0,50 gg<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, respectivamente, indicando a maior facilidade de degradação do furfural (Zhang et al., 2012). Segundo Taherzadeh e Karimi (2011), a bioconversão de furfural é mais rápida que a de 5-HMF, o que pode estar associado a maior toxicidade deste inibidor aos microrganismos.

No caso dos ácidos alifáticos, o mecanismo microbiano de tolerância se baseia no efluxo de prótons por H<sup>+</sup>-ATPases presentes na membrana plasmática, as quais realizam a manutenção do pH intracelular em detrimento da acidificação gerada pela presença destes ácidos (Jönsson et al., 2013). Além disso, o bombeamento dos respectivos ânions por transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) também é realizado por microrganismos (Guo et al., 2018), sendo ambos os processos realizados com gasto de ATP. Alguns microrganismos também realizam o metabolismo de ácido acético via conversão a acetil-CoA e incorporação no ciclo do ácido tricarboxílico ou no ciclo do glioxilato (Palma et al., 2018), como observado para *C. guilliermondii* em meio semidefinido contendo xilose e glicose (Felipe et al., 1995) e nos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço (Arruda, 2011) e de palha de cana (Hernández-Pérez, 2015). O ácido fórmico também pode ser consumido por alguns microrganismos, como *S. cerevisiae*, pela sua oxidação a dióxido de carbono e água por formato desidrogenases dependentes de NAD<sup>+</sup> (Guo et al., 2018).

Em relação aos compostos fenólicos, os mecanismos de tolerância incluem a redução da fluidez de membrana pela alteração da conformação de ácidos graxos da forma *cis* para *trans*, bem como pela saturação de suas cadeias acil, modificação da proporção lipídeo/proteína da membrana e aumento nos níveis de enzimas catalisadoras da degradação de espécies reativas de oxigênio, como catalases e superóxido dismutases (Sikkema et al., 1995). Mecanismos extras de tolerância ocorrem em bactérias gram-negativas, como a modificação na composição do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa (Sikkema et al., 1995). Fungos filamentosos, produzem ainda enzimas extracelulares, como lacases e peroxidases, que oxidam compostos fenólicos a radicais que se acoplam a moléculas maiores, se tornando menos tóxicos (Jönsson et al., 2013).

A modificação dos constituintes da parede celular também é um mecanismo de tolerância empregado por microrganismos na presença de inibidores (Sikkema et al., 1995). A parede celular é uma estrutura complexa e dinâmica que tem sua composição e arquitetura alteradas em função de condições ambientais. Fontes de carbono, condições operacionais, modos de cultivo, além de estados fisiológicos e morfológicos, afetam a composição da parede celular de leveduras, bem como sua espessura, arquitetura e conteúdo celular (Aguilar-Uscanga e François, 2003; Pereyra et al., 2018). *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* apresentaram diferentes composições, espessuras e quantidades de parede celular quando cultivadas em extrato solúvel de grãos secos de destilaria e em meio semidefinido contendo glicose (Pereyra et al., 2018). Estes autores relataram ainda diferenças na produção de parede celular por linhagens de *S. cerevisiae* isoladas a partir de ambiente suíno e soro de leite. Leveduras do gênero *Candida* possuem em suas paredes celulares uma camada interna de quitina, uma camada externa de manoproteínas altamente glicosiladas e, intermediária a estas, uma camada de  $\beta$ -glucanas ( $\beta$ -1,3-glucana e  $\beta$ -1,6-glucana), sendo as  $\beta$ -1,6-glucanas responsáveis por realizar a conexão entre as manoproteínas e as  $\beta$ -1,3-glucanas por meio de âncoras de GPI (Nogueira et al., 2017).

A parede celular fúngica também responde e neutraliza estresses ambientais pela remodelação dinâmica de sua composição, espessura e arquitetura (Nogueira et al., 2017). A presença de agentes perturbadores ativa mecanismos compensatórios da parede celular, permitindo seu remodelamento para combater a lise celular (Aguilar-Uscanga e François, 2003). Ao analisar o efeito da concentração mínima inibitória de caspofungina sobre seis espécies do gênero *Candida*, Nogueira et al. (2017) observaram o maior conteúdo de quitina,  $\beta$ -glucana e manoproteínas na parede celular de *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C.*



*krusei* quando comparado às células não expostas ao antifúngico. Para *C. lusitaniae*, foi observado o aumento de  $\beta$ -glucana e quitina, enquanto para *C. albicans* e *C. parapsilosis* o aumento foi apenas de quitina. A mudança no conteúdo destes constituintes foi relacionado ao aumento da resistência das células ao inibidor, sendo possível observar as diferenças existentes entre cada espécie. Aguilar-Uscanga e François (2003) associaram ainda a maior proporção de  $\beta$ -1,6-glucana à maior resistência à lise enzimática de *S. cerevisiae*.

O efluxo de compostos xenobióticos e drogas por transportadores ativos também é um dos mecanismos utilizados por leveduras na resistência a múltiplas drogas e xenobióticos e na superação dos efeitos deletérios provocados pela presença de inibidores, incluindo os compostos fenólicos encontrados em hidrolisados hemicelulósicos (Sá-Correia e Godinho, 2022; Sikkema et al., 1995). Transportadores ativos pertencentes às superfamílias ABC e facilitadora principal (MFS) estão frequentemente envolvidos no processo de resistência a compostos citotóxicos. Enquanto a família MFS realiza o antiporte de xenobióticos/inibidores e  $H^+$ , a família ABC realiza o transporte destes compostos movido pela hidrólise de ATP (Sá-Correia e Godinho, 2022). Além de sua atuação na excreção ativa de inibidores, estudos demonstram o papel desses transportadores no remodelamento e organização da membrana plasmática de *S. cerevisiae*, atuando em processos como na manutenção da assimetria da membrana pela translocação de fosfolípidos (Wang et al., 2017a) e redução da permeabilidade de membrana induzida por compostos lipofílicos pelo transporte de ergosterol (Godinho et al., 2018).

Além destes mecanismos, o próprio metabolismo de alguns microrganismos atua na conversão destes compostos a derivados de menor toxicidade (Jönsson et al., 2013), como *S. cerevisiae* que converte aldeído coniferílico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e vanilina a derivados de menor toxicidade (Adeboye et al., 2015, 2014). Adeboye et al. (2015) observaram a degradação de 1,1 mM de aldeído coniferílico, 1,8 mM de ácido ferúlico e 9,7 mM de ácido *p*-cumárico por *S. cerevisiae*, bem como a formação de diferentes intermediários de menor toxicidade oriundos do metabolismo destes fenólicos. Leveduras do gênero *Candida* e *Trichosporon* também são descritas como capazes de metabolizar compostos fenólicos como fontes de carbono e energia (Wang et al., 2009). Os autores observaram a degradação anaeróbica de fenol e *m*-cresol, por *Candida albicans*, sendo a formação de compostos intermediários, como benzoato, 4-hidroxibenzoato, 3-hidroxibenzoato, succinato e acetato observada ao longo do processo de degradação. Além disso, a capacidade de *C. albicans* em degradar benzoato, tolueno, *o*-cresol e 4-clorofenol também foi relatada. No caso de *C. tropicalis*, a degradação completa de 10 mg de fenol a

gás carbônico e água foi observada após 20 h de cultivo, bem como a degradação de 2,6-dimetilfenol, porém a uma menor velocidade (Phalgune et al., 2013).

## 2.5 Adaptação celular

A toxicidade de hidrolisados aos microrganismos se mostra um dos principais desafios enfrentados no desenvolvimento e implementação de bioprocessos baseados na utilização de biomassas lignocelulósicas (Guo e Olsson, 2014). Diferentes metodologias são propostas para superar esta toxicidade, como a destoxificação dos hidrolisados, engenharia genética e mutação/adaptação dos microrganismos, encapsulamento de células e fermentações contínua, em batelada alimentada ou com alta densidade de células (Tahezadeh e Karimi, 2011). A destoxificação dos hidrolisados é frequentemente realizada para reduzir a concentração de inibidores através de processos como evaporação à vácuo, *overliming*, extração líquido-líquido (López-Linares et al., 2018), biossorção (Jofre et al., 2021), adsorção em resinas de troca iônica (Arruda et al., 2011) e polímeros a base de taninos (Silva-Fernandes et al., 2017) e combinação de ajuste de pH e adsorção em carvão ativado (Marton et al., 2006). Por apresentar baixo custo e eficiência, este último é amplamente difundido (Hernández-Pérez et al., 2019), apresentando, contudo, desvantagens como a geração de resíduos, a perda de açúcares fermentescíveis, e a necessidade de regeneração do carvão ativado, o que frequentemente corresponde a um processo complexo (El Gamal et al., 2018; Santos et al., 2014).

A adaptação dos microrganismos aos hidrolisados é descrita como uma forma eficiente de superação da toxicidade, podendo ser utilizada como uma estratégia alternativa ou complementar à destoxificação (Tahezadeh e Karimi, 2011). As abordagens adaptativas têm sido empregadas para a maximização da tolerância de microrganismos a inibidores (Guo et al., 2018), se destacando como promissoras no desenvolvimento de linhagens robustas e tolerantes a compostos tóxicos, além de serem consideradas de baixo custo quando comparadas aos métodos de destoxificação (Misra et al., 2013; Tomás-Pejó et al., 2010; Rao et al., 2016). A adaptação do microrganismo também pode permitir a produção de produtos de interesse em quantidades desejáveis, o qual seria normalmente produzido em baixas quantidades ou até mesmo não produzido, além de possibilitar a realização de fermentações em batelada em série, de forma que a planta de produção possa ser operada quase continuamente, reduzindo o tempo total de operação (Misra et al., 2013).

A estratégia de reciclagem de *C. guilliermondii* utilizada por Sene et al. (1998) a partir de cultivos sucessivos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana permitiu a realização de cinco ciclos de fermentação sem perda de rendimento e produtividade volumétrica de xilitol, sendo este resultado interessante para operação em escala industrial.

A adaptação evolutiva, também conhecida como engenharia evolutiva, é uma metodologia de adaptação de longo prazo em que os microrganismos são submetidos a concentrações crescentes de inibidores por longos períodos, adquirindo tolerância aos tóxicos por meio de mutações genéticas (Nielsen et al., 2015). Este procedimento mimetiza a seleção natural conduzida pela natureza, tendo como princípio a melhoria das propriedades celulares pela exposição dos microrganismos aos inibidores em cultivos sucessivos, sendo eficiente para o aumento da tolerância aos inibidores e da eficiência fermentativa (Almeida et al., 2007; van Dijk et al., 2020). Segundo Soares et al. (2020), embora a adaptação evolutiva seja um método simples, de baixo custo e seguro para ser realizado em escala industrial, diferentemente de microrganismos geneticamente modificados que requerem cuidados especiais em seus manuseios, existe o risco de que os microrganismos evoluídos para um perfil específico de inibidores não atinjam a eficiência desejada em outros perfis, o que pode acontecer visto que a composição dos hidrolisados é dependente da matéria-prima, da sazonalidade e do pré-tratamento empregado (van Dijk et al., 2020). Deste modo, os microrganismos evoluídos não são diretamente transferíveis entre hidrolisados de diferentes biomassas ou pré-tratamentos, podendo requerer uma aclimatização quando submetidos a novas condições (Zhang et al., 2019).

Alternativamente, uma estratégia adaptativa eficiente e promissora para aumentar a tolerância microbiana a inibidores é a pré-adaptação, em que o microrganismo é exposto aos inibidores presentes no meio de fermentação durante a etapa de propagação celular (Aulitto et al., 2019; Gu et al., 2019). A tolerância aos inibidores pode ser induzida pela pré-exposição dos microrganismos aos inibidores em meio definido ou em hidrolisados diluídos (Narayanan et al., 2016). Este processo induz a resposta geral da célula ao estresse, fornecendo ao microrganismo uma adaptação de curto prazo que contribui para a redução dos efeitos inibitórios dos hidrolisados e para o aumento da viabilidade celular, do rendimento de biomassa e da performance fermentativa (Nielsen et al., 2015; Tomás-Pejó e Olsson, 2015; van Dijk et al., 2020). Diferentemente da adaptação evolutiva que induz alterações genotípicas nos microrganismos, neste caso a adaptação é expressa fenotipicamente. A pressão seletiva exercida pelos inibidores durante a pré-exposição reprograma vias metabólicas e maquinarias regulatórias dos microrganismos e desenvolve

fenótipos mais resistentes (Kim, 2019; Nielsen et al., 2015). Contudo, um requisito para a utilização desta abordagem é a existência de uma tolerância induzível, que é intrínseca ao microrganismo e permite sua propagação na presença dos inibidores (Aulitto et al., 2019).

Desse modo, a pré-adaptação tem sido uma abordagem utilizada por diferentes pesquisadores para ampliar a performance fermentativa de microrganismos frente a toxicidade dos hidrolisados lignocelulósicos. Tomás-Pejó e Olsson (2015) relataram o aumento de 98 e 80 % no consumo de xilose e no rendimento de etanol, respectivamente, para *S. cerevisiae* recombinante pré-adaptada em hidrolisado de palha de trigo 23 % (vv<sup>-1</sup>) e cultivada em hidrolisado de palha de trigo 50 % (vv<sup>-1</sup>). Nielsen et al. (2015) também observaram que a pré-adaptação de *S. cerevisiae* recombinante em hidrolisado de palha de trigo com concentrações de tóxicos equivalentes a 2,5, 5 e 10 % de sólidos insolúveis em água (WIS) favoreceu a performance fermentativa da levedura na sacarificação e co-fermentação simultânea de 10 % WIS. Segundo os autores, a levedura pré-adaptada apresentou um aumento no consumo de glicose e xilose, resultando em aumentos de 10 e 45 % na viabilidade celular e na produção de etanol, respectivamente. Para *Bacillus coagulans* cultivado em hidrolisado celulósico de palha de trigo, foi observada a redução de 50 % do tempo de conversão de glicose à ácido láctico, bem como o aumento de 50 e 115 % na produtividade volumétrica e específica deste ácido, respectivamente, por células pré-adaptadas em hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo 30 % (Aulitto et al., 2019). Para *E. coli* recombinante cultivada em hidrolisado hemicelulósico de kenaf, a pré-adaptação em concentrações crescentes do hidrolisado aumentou o consumo de xilose de 26,3 para 62,7 % e do rendimento e produtividade volumétrica de xilitol de 0,28 para 0,31 gg<sup>-1</sup> e de 0,05 para 0,10 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, respectivamente (Shah et al., 2020).

Melhorias na performance fermentativa em função da pré-adaptação também foram observadas para leveduras do gênero *Candida*. Matos (2004) relatou para *C. guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e pré-adaptada em concentrações crescentes do hidrolisado uma melhoria na assimilação de xilose e arabinose e na produção de xilitol. Segundo o autor, a levedura adaptada apresentou um aumento 38,3 % no consumo de xilose e de 47 % na produção de xilitol, resultando em um aumento de 8,6 e 44 % no rendimento e produtividade volumétrica, respectivamente. Sene et al. (1998) observaram, para esta mesma levedura cultivada no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, que a pré-adaptação em concentrações crescentes do hidrolisado favoreceu o consumo de xilose e a produção de xilitol. Para *C. tropicalis* cultivada em hidrolisado de

fibra de cacho de frutas de palma, observou-se aumentos de 1,7 e cinco vezes no crescimento celular e no consumo de xilose, respectivamente, pela levedura pré-adaptada por 10 ciclos em hidrolisado 10 % (vv<sup>-1</sup>), e um aumento de 9,62 gL<sup>-1</sup> na produção de xilitol (Kim, 2019). Rao et al. (2006) também relataram a melhoria da performance fermentativa de *C. tropicalis* pré-adaptada e cultivada nos hidrolisados de fibra de milho e bagaço de cana. Segundo os autores, a levedura pré-adaptada por 10 ciclos ao hidrolisado de fibra de milho teve um aumento de 0,43 para 0,49 gg<sup>-1</sup> no rendimento de xilitol, enquanto para o hidrolisado de bagaço de cana este aumento foi de 0,45 para 0,52 gg<sup>-1</sup>.

A melhoria da performance fermentativa é descrita como dependente do número de ciclos que os microrganismos são submetidos. Desse modo, o aumento do número de passagens proporciona um melhoramento gradual da performance fermentativa microbiana (Kim, 2019; Rao et al., 2006). Kim (2019) observou um aumento gradual do crescimento celular, do consumo de xilose e da produção de xilitol por *C. tropicalis* adaptada em hidrolisado de fibra de cacho de frutas de palma 10 % (vv<sup>-1</sup>) à medida que eram realizados os 10 ciclos aos quais a levedura foi submetida. Comportamento similar foi observado para o rendimento de xilitol quando *C. tropicalis* foi adaptada nos hidrolisados de fibra de milho e de bagaço de cana-de-açúcar por 20 ciclos (Rao et al., 2006).

As estratégias adaptativas, além de melhorarem a performance fermentativa, também aumentam a taxa de conversão de inibidores a derivados de menor toxicidade (Landaeta et al., 2013). Nielsen et al. (2015) observaram que a pré-adaptação de *S. cerevisiae* recombinante em hidrolisado hemicelulósico contendo concentrações de tóxicos equivalentes a 5 e 10 % WIS aumentou a taxa de conversão de furfural quando a levedura foi cultivada em 10 % WIS. Segundo os autores, a levedura adaptada apresentou uma superexpressão dos genes *ZWF1* e *ADH6*, codificantes das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e álcool desidrogenase, respectivamente, responsáveis por converter furfural aos seus derivados de menor toxicidade. Landaeta et al. (2013) também observaram, para *S. cerevisiae* adaptada às concentrações crescentes de ácido acético, furfural, 5-HMF, siringaldeído, vanilina e ácido 4-hidroxibenzóico por 39 gerações, o aumento das taxas de conversão de furfural, 5-HMF e siringaldeído quando comparada à linhagem não adaptada. Comportamento similar foi observado por Narayanan et al. (2016) durante cultivo anaeróbico de *S. cerevisiae* em meio semidefinido contendo glicose, ácido acético, furfural, 5-HMF e vanilina. Ao pré-adaptarem a levedura por cinco ciclos no mesmo meio de cultivo, os autores observaram um aumento de 10, 65 e 60 % na conversão de furfural, 5-HMF e vanilina, respectivamente, aos seus respectivos álcoois.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

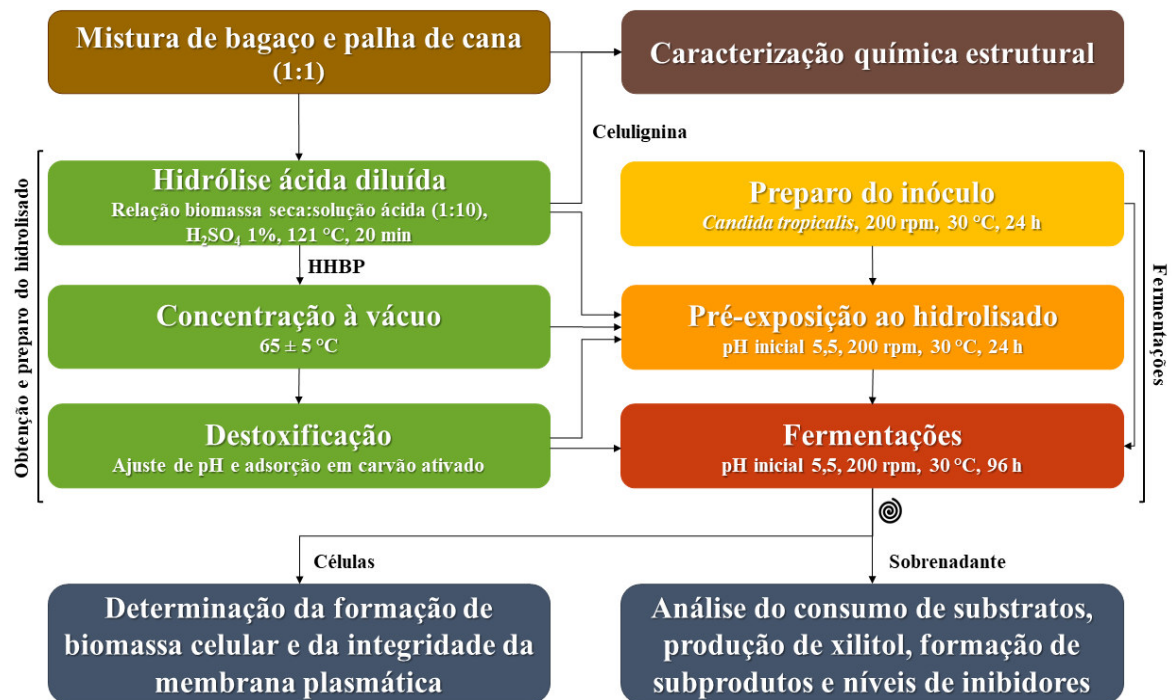
Contribuir com o desenvolvimento da tecnologia de produção biotecnológica de xilitol pelo entendimento de respostas metabólicas e fisiológicas de *Candida tropicalis* frente aos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (HHBP).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a performance fermentativa de *C. tropicalis* durante cultivo em HHBP concentrado e destoxificado em função da adaptação em hidrolisados com diferentes características químicas;
- Analisar alterações no consumo dos inibidores de origem lignocelulósica presentes no HHBP concentrado e destoxificado por *C. tropicalis* em função da adaptação da levedura;
- Avaliar a integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* em resposta a adaptação no HHBP com diferentes características químicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos descritos abaixo foram realizados no Laboratório de fermentações VI e nas dependências do Departamento de Biotecnologia, ambos pertencentes à Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo (EEL-USP). A Figura 5 apresenta uma representação esquemática das etapas realizadas no presente trabalho.



**Figura 5.** Diagrama de fluxo das etapas realizadas no presente trabalho.

### 4.1 Matéria-prima

O bagaço e a palha de cana-de-açúcar (Figura 6), provenientes da safra de 2019/20, foram doados pela Usina Pederneiras, localizada na cidade de Tietê, SP e pela Usina Santa Lúcia, localizada na cidade de Araras, SP, respectivamente. Após seu recebimento, a palha foi triturada mecanicamente em moedor de palha e ambos os subprodutos foram secos em estufa a 35 °C para manutenção da umidade a aproximadamente 10 %, a qual foi determinada a 105 °C em balança de peso seco rápido com câmara de infravermelho. Os subprodutos secos foram armazenados nas dependências do Departamento de Biotecnologia da EEL-USP a temperatura ambiente até sua utilização.



**Figura 6.** Bagaço de cana (A), palha de cana (B) e mistura de bagaço e palha de cana (1:1) (C).

## 4.2 Caracterização química estrutural da biomassa *in natura* e da celulignina

A mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1), bem como as biomassas individuais e a celulignina resultante do processo de hidrólise ácida diluída, foram caracterizadas quanto às suas umidades e composições químicas estruturais – celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas.

### 4.2.1 Extrativos

Amostras de bagaço e palha de cana foram moídas a 20 Mesh e misturadas na proporção 1:1. Aproximadamente 1,4 g da mistura, bem como das biomassas individuais, foram armazenadas em papel de filtro e acondicionadas em Soxhlet para extração com etanol 95% por 6 h (Ferraz et al., 2000). Após a extração, as biomassas foram secas a temperatura ambiente e pesadas. A umidade das biomassas foi determinada antes e após o processo de extração, sendo o teor de extrativos calculado a partir da diferença de massa seca inicial (com extrativos) e massa seca final (sem extrativos). Este processo foi realizado em triplicata.

### 4.2.2 Lignina solúvel, lignina insolúvel e açúcares

A determinação de lignina solúvel, lignina insolúvel e açúcares foi realizada para as biomassas *in natura* e para a celulignina conforme estabelecido por Ferraz et al. (2000). Para isso, cerca de 0,33 g (massa seca) das biomassas *in natura* sem extrativos e da celulignina moída a 20 Mesh foram adicionadas, em triplicata, a tubos de ensaio nos quais



também foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico 72 % (vv<sup>-1</sup>). A mistura foi acondicionada em banho termostaticado a 30 °C por 1 h, sendo agitada com bastão de vidro a cada 15 min. Em seguida, a mistura foi transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL, nos quais foram adicionados 79 mL de água destilada. Os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados a 121 °C e 1 atm por 1 h. Após resfriamento a temperatura ambiente, os hidrolisados foram filtrados em cadinho de placa sinterizada n° 3 previamente tarados. A fração líquida foi avolumada para 200 mL com água destilada, enquanto o resíduo sólido foi seco em estufa a 100 °C até atingir massa constante.

A lignina solúvel foi determinada a 205 nm em espectrofotômetro UV-visível (Thermo Scientific Evolution 201 - absorvidade da lignina solúvel 105 Lg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) a partir da fração líquida obtida. Já a lignina insolúvel foi determinada mediante a diferença de peso seco das amostras antes e após a hidrólise ácida. Para a determinação de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e ácido acético, o hidrolisado foi filtrado em filtros C18 Sep Pak e posteriormente analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) conforme descrito no item 4.5.2. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.2.3 Cinzas

A determinação de cinzas foi realizada conforme estabelecido por Sluiter et al. (2008). Cadinhos de porcelana foram inicialmente tarados em mufla a 575 °C por 3 h, sendo, em seguida, resfriados em dessecador a temperatura ambiente. Cerca de 0,4 g (massa seca) das biomassas *in natura* e da celulignina foram pesadas nos cadinhos, em triplicata, os quais foram, em seguida, tampados e mantidos em mufla utilizando a rampa de aquecimento determinada por Sluiter et al. (2008). Após 1 h a 575 °C, os cadinhos foram destampados e esperou-se a mufla resfriar. Em seguida, os cadinhos foram retirados da mufla e colocados em dessecador para estabilização da temperatura, sendo pesados após isso. O teor de cinzas foi determinado pela diferença de peso das amostras antes e após este processo conforme Equação 1, em que M<sub>C</sub> corresponde à massa de cinzas (g) presente nas amostras e M<sub>A</sub> à massa de amostra seca (g) utilizada.

$$\%_{Cinzas} = \frac{M_C}{M_A} \times 100 \% \quad (1)$$

### **4.3 Obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico da mistura 1:1 de bagaço e palha de cana-de-açúcar (HHBP)**

#### *4.3.1 Hidrólise ácida diluída*

A hidrólise ácida diluída com ácido sulfúrico foi empregada para a obtenção do HHBP. Para a realização da hidrólise, utilizou-se um reator de aço inoxidável (Allbiom, Cajuru, SP) com capacidade máxima de 80 L, empregando as seguintes condições operacionais: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 %, relação biomassa seca:solução ácida 1:10 (mv<sup>-1</sup>), 121 °C e 20 min (Hernández-Pérez, 2019). O HHBP foi filtrado e armazenado em câmara fria a 2,4 °C para posterior utilização, enquanto a fração sólida (celulignina) foi lavada até que a água de lavagem atingisse pH 7. Em seguida a celulignina foi seca em estufa a 35 °C e armazenada para posterior caracterização química estrutural conforme descrito no item 4.2

#### *4.3.2 Concentração à vácuo*

Visando o aumento da concentração de açúcares, o HHBP foi concentrado à vácuo a 65 ± 5 °C para a obtenção de teor de xilose de aproximadamente 70 gL<sup>-1</sup>, conforme estabelecido por Rodrigues et al. (2003). Para reduzir a formação de espuma, 1 mL de antiespumante foi adicionado por litro de hidrolisado carregado no concentrador. O HHBP concentrado foi armazenado em câmara fria a 2,4 °C para posterior uso.

#### *4.3.3 Destoxificação*

Após concentrado, o HHBP foi destoxificado pelo método combinado de ajuste de pH e adsorção em carvão vegetal ativado, conforme estabelecido por Marton et al. (2006). Para isso, inicialmente o pH do hidrolisado foi elevado para 7,0 com CaO e reduzido na sequência para 2,5 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Em seguida, carvão vegetal ativado 1,0 % (mv<sup>-1</sup>) foi adicionado ao HHBP concentrado, o qual foi mantido a 60 °C e 100 rpm por 30 min. Os precipitados formados durante o processo foram removidos por filtração à vácuo e o HHBP concentrado e destoxificado foi autoclavado a 110 °C e 0,5 atm por 15 min para utilização nas fermentações.

#### 4.3.4 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico

Os hidrolisados hemicelulósicos obtidos nas etapas de hidrólise ácida diluída, concentração e destoxificação foram caracterizados quanto ao pH e concentrações de açúcares (xilose, glicose e arabinose) e de compostos inibidores (ácido acético, furfural, 5-HMF, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, pirocatecol, siringaldeído, vanilina e compostos fenólicos totais), conforme descrito no item 4.5.

### 4.4 Avaliação da fermentabilidade do HHBP concentrado e destoxificado frente a adaptação de *Candida tropicalis*

#### 4.4.1 Microrganismo e preparo do inóculo

Para a avaliação da fermentabilidade do HHBP concentrado e destoxificado frente a adaptação do inóculo, empregou-se a levedura *Candida tropicalis* FTI 20037, selecionada por Barbosa et al. (1988) como *Candida guilliermondii* FTI 20037 e recentemente reclassificada por Queiroz (2019). *C. tropicalis* FTI 20037 foi inicialmente ativada em caldo Sabouraud a 30 °C e 200 rpm por 24 h e mantida a 4 °C em ágar extrato de malte. Colônias isoladas de *C. tropicalis* foram utilizadas na preparação do inóculo em frascos Erlenmeyer preenchidos com meio semidefinido constituído por (gL<sup>-1</sup>): xilose (30), extrato de farelo de arroz (20), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,0) e CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (0,1) (relação volume frasco:volume de meio de 2,5:1) a 30 °C e 200 rpm por 24 h. Em seguida, as células foram recuperadas por centrifugação (3000 rpm, 15 min), lavadas e ressuspensas com água destilada estéril para utilização como inóculo na etapa de adaptação com uma concentração inicial de células de 1,0 gL<sup>-1</sup>.

#### 4.4.2 Adaptação do inóculo

Previamente às fermentações, realizou-se uma etapa de propagação da levedura em três hidrolisados com diferentes características químicas, de modo a fornecer uma adaptação de curto prazo à levedura e avaliar quais hidrolisados apresentariam as melhores características para realizar tal etapa. Os hidrolisados empregados foram:

- I. HHBP;
- II. HHBP concentrado;
- III. HHBP concentrado e destoxificado.

O inóculo de *C. tropicalis* preparado previamente foi empregado no cultivo destes hidrolisados suplementados com os mesmos nutrientes descritos no item 4.4.1. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer empregando relação volume frasco:volume de meio de 2,5:1, pH inicial 5,5, 200 rpm e 30 °C por 24 h. Após isso, as células foram recuperadas por centrifugação (3000 rpm, 15 min), lavadas e ressuspensas em água destilada estéril para obter uma suspensão de células e iniciar as fermentações com uma concentração celular inicial de 1,0 gL<sup>-1</sup>.

#### 4.4.3 Fermentações

As células obtidas na etapa de adaptação foram utilizadas nas fermentações do HHBP concentrado e destoxificado, empregando a mesma relação frasco:volume de meio, pH, agitação e temperatura descritas na etapa anterior e tempo de cultivo de 96 h. Alíquotas de cada fermentação foram retiradas em 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24, 48, 72 e 96 h para análise do crescimento celular, aferição do pH, consumo de açúcares, formação de xilitol e dos subprodutos etanol e glicerol e teor de inibidores. As condições avaliadas nesta etapa foram:

- A. HHBP concentrado e destoxificado com inóculo não adaptado;
- B. HHBP concentrado e destoxificado com inóculo adaptado ao HHBP;
- C. HHBP concentrado e destoxificado com inóculo adaptado ao HHBP concentrado;
- D. HHBP concentrado e destoxificado com inóculo adaptado no HHBP concentrado e destoxificado.

Além das condições de adaptação, foi realizada uma fermentação controle em meio semidefinido contendo glicose e xilose como fontes de carbono em concentrações similares às do HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado.

O desempenho da levedura, em função da adaptação nos hidrolisados, foi avaliado pela determinação de parâmetros cinéticos e fermentativos como velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), velocidades volumétricas ( $r_{Gli}$ ,  $r_S$ ,  $r_{Ara}$ , Equações 2) e específicas ( $\mu_{Gli}$ ,  $\mu_S$ ,

$\mu_{Ara}$ , Equações 3) de consumo de glicose, xilose e arabinose, respectivamente, fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ , Equação 4), produtividade volumétrica de xilitol e velocidade específica de produção de xilitol ( $Q_P$  e  $\mu_P$ , Equações 5), eficiência de bioconversão de xilose em xilitol ( $\eta$ , Equação 6) e produtividade volumétrica de etanol e velocidade específica de produção de etanol ( $Q_E$  e  $\mu_E$ , Equações 7), sendo:  $G$ ,  $S$ ,  $A$ ,  $P$ ,  $X$ ,  $E$  e  $T$  correspondente às concentrações ( $gL^{-1}$ ) de glicose, xilose, arabinose, xilitol, biomassa celular, etanol e tempo de fermentação (h), respectivamente;  $i$  e  $f$  subscritos referentes aos tempos inicial e final, respectivamente;  $Y_{P/S\ teo}$  correspondente ao fator de conversão de xilose em xilitol teórico ( $0,917\ gg^{-1}$ ) determinado por Barbosa et al. (1988). A velocidade específica de crescimento foi determinada pela regressão linear entre os valores de  $\ln DO_{600\ nm}$  obtidos na fase exponencial de crescimento e tempo (h).

$$r_{Gli} = -\frac{\Delta G}{\Delta T} = -\frac{G_f - G_i}{T_f - T_i} \quad r_S = -\frac{\Delta S}{\Delta T} = -\frac{S_f - S_i}{T_f - T_i} \quad r_{Ara} = -\frac{\Delta A}{\Delta T} = -\frac{A_f - A_i}{T_f - T_i} \quad (2)$$

$$\mu_{Gli} = -\frac{1}{X} \frac{\Delta G}{\Delta T} \quad \mu_S = -\frac{1}{X} \frac{\Delta S}{\Delta T} \quad \mu_{Ara} = -\frac{1}{X} \frac{\Delta A}{\Delta T} \quad (3)$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (4)$$

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta T} = \frac{P_f - P_i}{T_f - T_i} \quad \mu_P = \frac{1}{X} \frac{\Delta P}{\Delta T} \quad (5)$$

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S\ teo}} \times 100\% \quad (6)$$

$$Q_E = \frac{\Delta E}{\Delta T} = \frac{E_f - E_i}{T_f - T_i} \quad \mu_E = \frac{1}{X} \frac{\Delta E}{\Delta T} \quad (7)$$

## 4.5 Métodos analíticos

### 4.5.1 Determinação da concentração e viabilidade celular

A concentração celular de *C. tropicalis* foi determinada por espectrofotometria a 600 nm empregando um espectrofotômetro DU 800 (Beckham Coulters), mediante relação entre absorbância e concentração celular previamente estabelecida em curva de calibração empregando células cultivadas em meio semidefinido contendo glicose e xilose como fontes de carbono. A viabilidade celular foi determinada por coloração a fresco das células com o corante vital azul de metileno 0,01 % e visualização em microscópio óptico.

### 4.5.2 Determinação das concentrações de açúcares, xilitol, etanol, glicerol, ácido acético, furanos e fenólicos

A determinação da concentração de açúcares (glicose, xilose e arabinose), xilitol, etanol, glicerol e ácido acético foi realizada por CLAE empregando  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,005 \text{ molL}^{-1}$  como eluente a um fluxo de  $0,6 \text{ mLmin}^{-1}$  e coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hércules, CA) a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  (Arruda, 2011). Para isso as amostras foram diluídas e filtradas em filtros Sep Pak. A detecção destas moléculas foi realizada empregando detector de índice de refração.

A análise de furanos (furfural e 5-HMF) e fenólicos (ácido 4-hidroxibenzóico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, pirocatecol, siringaldeído e vanilina) foi realizada conforme estabelecido por Skendi et al. (2017) empregando coluna Zorbax C18 (Agilent, Santa Clara, CA) a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e gradiente de ácido acético 1% em água (A), acetonitrila (B) e metanol (C) a um fluxo de  $1,3 \text{ mLmin}^{-1}$ . Em 0 min empregou-se 90% do A e 10% de C, sendo esta proporção alterada para 80% de A, 4% de B e 16% de C em 10 min, a qual foi mantida fixa até 14 min. Em seguida, foi configurado 100% de B para limpeza da coluna e em 18 min retomou-se as condições iniciais para reequilíbrio da coluna. A detecção dos compostos analisados foi realizada por detector de UV, sendo furfural, 5-HMF, ácido gálico, pirocatecol, vanilina e siringaldeído detectados a 280 nm, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido vanílico detectados a 260 nm e ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico detectados a 320 nm.

#### 4.5.3 Determinação da concentração de compostos fenólicos totais

A análise da concentração de compostos fenólicos totais foi realizada por espectrofotometria, conforme metodologia descrita por Arruda (2011). Para isso, as amostras foram diluídas com água deionizada e, em seguida, o pH foi ajustado para 12 empregando solução de NaOH 6 molL<sup>-1</sup>. A concentração de fenólicos totais foi determinada a 280 nm, sendo o cálculo de suas concentrações baseado nas Equações 8 e 9, em que  $CF$  corresponde à concentração de compostos fenólicos totais (gL<sup>-1</sup>),  $A_{t280}$  corresponde à absorbância da amostra e  $A_{pd280}$  à absorbância dos furanos (furfural e 5-HMF).  $C_{Fur}$  e  $C_{HMF}$  correspondem às concentrações de furfural e 5-HMF (gL<sup>-1</sup>), respectivamente, determinadas por CLAE, e  $\epsilon_{Fur}$  e  $\epsilon_{HMF}$  correspondem às absorvidades destes compostos, iguais a 146,85 e 114,00 Lg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, respectivamente.

$$CF = \left( 4,187 \times 10^{-2} \times (A_{t280} - A_{pd280}) \right) - 3,279 \times 10^{-4} \quad (8)$$

$$A_{pd280} = (C_{Fur} \times \epsilon_{Fur}) + (C_{HMF} \times \epsilon_{HMF}) \quad (9)$$

#### 4.5.4 Integridade de membrana plasmática

A análise da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* foi realizada por microscopia de fluorescência empregando o fluoróforo iodeto de propídeo após 0, 24 e 48 h de fermentação, conforme metodologia baseada em Crowley et al. (2016). O iodeto de propídeo é uma pequena molécula florescente que não atravessa passivamente a membrana plasmática das células, penetrando apenas membranas permeáveis e porosas e se intercalando ao DNA. Deste modo, o uso do iodeto de propídeo permite a discriminação de células com a membrana íntegra e não íntegras pela sua excitação entre 400 e 600 nm e detecção da emissão entre 600 e 700 nm (Crowley et al., 2016). Como a maioria dos estudos com este fluoróforo são realizados por citometria de fluxo, testes preliminares foram realizados para a determinação da concentração de células a ser utilizada e das condições de coloração, sendo definido para as análises deste trabalho a utilização de 1,0 gL<sup>-1</sup> de células, 10 µgmL<sup>-1</sup> de iodeto de propídeo e 15 minutos de coloração. Inicialmente, uma alíquota do meio fermentado foi diluída para obter uma suspensão de 1 gL<sup>-1</sup> de células em 1 mL, a qual foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi

descartado e as células foram ressuspensas em 990  $\mu\text{L}$  de solução salina tamponada com fosfato (NaCl 137 mM, KCl 27 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8 mM, pH 7,4). 10  $\mu\text{L}$  da solução estoque de iodeto de propídio ( $1 \text{ mgmL}^{-1}$ ) foram adicionados a solução de células em suspensão, atingindo a concentração final de  $10 \mu\text{gmL}^{-1}$ . Em seguida, as células foram encubadas no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. A fluorescência das células foi visualizada em microscópio de fluorescência Olympus BX53 equipado com os sistemas de iluminação Olympus CBM e Xcite 120 LED e as imagens foram adquiridas e processadas empregando o software CellSens 8.0.

*C. tropicalis* cultivada em meio semidefinido contendo glicose e xilose foi utilizada para a realização do controle negativo pela análise da autofluorescência das células sem a presença do iodeto de propídeo. Células oriundas desta mesma fermentação foram autoclavadas a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 min e empregadas na realização do controle positivo da análise. Estas células também foram empregadas na determinação do tempo de coleta da fluorescência, o qual foi fixado em 285,7 ms para todas as análises, e do filtro U-FBW, que realiza a excitação de fluoróforos de 460 a 495 nm e coleta a emissão da fluorescência a partir de 510 nm.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização química estrutural da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1)

O bagaço e a palha de cana-de-açúcar, assim como a mistura destas biomassas (1:1), foram caracterizadas quanto aos seus conteúdos de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas, sendo estes resultados apresentados na Tabela 2. Referente à composição química da mistura de bagaço e palha de cana, matéria-prima empregada neste trabalho para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico utilizado na produção de xilitol, foi observada a presença de aproximadamente 37,52 % de celulose, 25,40 % de hemicelulose, 23,54 % de lignina, 1,74 % de extrativos e 2,82 % de cinzas. Destaca-se que a fração hemicelulósica corresponde a 40,37 % do conteúdo de carboidratos da mistura de bagaço e palha de cana e que 80,63 % desta fração é composta por xilana. Deste modo, cerca de 32,55 % do conteúdo total de carboidratos deste material equivale a xilose, carboidrato de interesse para o presente trabalho. Resultado similar foi encontrado por Hernández-Pérez (2019), que relatou a presença de 33,87 % de xilana no conteúdo total de carboidratos da mistura de bagaço e palha de cana. Tais dados enfatizam o potencial da aplicação da mistura de bagaço e palha de cana como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol. Em relação à caracterização das biomassas separadas, não foram observadas flutuações nos teores destes componentes, estando presentes em percentuais próximos aos observados para a mistura de bagaço e palha (Tabela 2). Além disso, conteúdos similares de celulose, hemicelulose e lignina foram observados para o bagaço e para a palha de cana. Contudo, a palha apresentou um maior conteúdo de extrativos e cinzas que o bagaço, o que pode estar associado à realização de lavagens do bagaço nas usinas e à disposição da palha sobre o solo após a colheita da cana. O maior conteúdo de cinzas e extrativos na palha também foi reportado por outros autores (Ávila et al., 2018; Hernández-Pérez, 2019; Jofre, 2019).

**Tabela 2.** Caracterização química estrutural do bagaço e palha de cana-de-açúcar, separados e em mistura (1:1), e da celulignina. Balanço de massa do processo de hidrólise ácida diluída.

| Biomassa   | Composição química (%) |              |              |             |             |             |             |
|--|------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|  | Lignina                | Celulose     | Hemicelulose |             |             | Extrativos  | Cinzas      |
|  |                        |              | Xilana       | Arabinosil  | Acetil      |             |             |
| Bagaço de cana <i>in natura</i>                          | 23,76 ± 0,62           | 39,08 ± 0,82 | 20,61 ± 0,47 | 2,05 ± 0,19 | 2,76 ± 0,05 | 0,47 ± 0,29 | 2,13 ± 0,34 |
| Palha de cana <i>in natura</i>                           | 22,14 ± 0,26           | 36,30 ± 0,87 | 19,59 ± 0,32 | 2,91 ± 0,04 | 2,10 ± 0,07 | 3,91 ± 0,44 | 5,58 ± 1,33 |
| Mistura de bagaço e palha de cana (1:1) <i>in natura</i> | 23,54 ± 0,94           | 37,52 ± 0,44 | 20,48 ± 0,37 | 2,44 ± 0,06 | 2,48 ± 0,02 | 1,74 ± 0,50 | 2,82 ± 0,40 |
| Celulignina  | 32,25 ± 1,89           | 49,72 ± 0,73 | 11,79 ± 2,22 | 0,86 ± 0,16 | 1,04 ± 0,25 | 0,00 ± 0,00 | 4,27 ± 0,24 |

| Biomassa   | Rendimento de sólidos (%) | Balanço de massa (g/100g de material <i>in natura</i> ) |          |              |            |        |            |        |
|--|---------------------------|---|----------|--------------|------------|--------|------------|--------|
|  |                           | Lignina   | Celulose | Hemicelulose |            |        | Extrativos | Cinzas |
|  |                           |   |          | Xilana       | Arabinosil | Acetil |            |        |
| Bagaço de cana <i>in natura</i>                          | 100                       | 23,76   | 39,08    | 20,61        | 2,04       | 2,75   | 0,47       | 2,13   |
| Palha de cana <i>in natura</i>                           | 100                       | 22,14   | 36,30    | 19,59        | 2,91       | 2,10   | 3,91       | 5,58   |
| Mistura de bagaço e palha de cana (1:1) <i>in natura</i> | 100                       | 23,54   | 37,52    | 20,48        | 2,44       | 2,48   | 1,74       | 2,82   |
| Celulignina  | 71,4                      | 23,02   | 35,49    | 8,41         | 0,62       | 0,74   | 0,00       | 3,05   |

Resultados similares de caracterização da mistura de bagaço e palha de cana (1:1) foram observados por outros autores. Contudo, é importante salientar que a composição química do bagaço e da palha de cana, assim como de outras biomassas lignocelulósicas, é variável, sendo dependente de fatores, como parâmetros ambientais e de cultivo, genótipo da planta, local e ano de cultivo, idade da cultura, métodos de colheita e doenças (Benjamin et al., 2014). Ávila et al., (2018) relataram uma composição química equivalente a 41,99 % de celulose, 30,25 % de hemicelulose, 23,74 % de lignina, 2,97 % de extrativos e 3,54 % de cinzas para a mistura de bagaço e palha de cana (1:1). Jofre (2019) observou a presença de 37,00 % de celulose, 27,58 % de hemicelulose, 22,02 % de lignina, 7,89 % de extrativos e 5,59 % de cinzas. Moutta et al. (2014), por sua vez, observou uma proporção semelhante de hemicelulose à encontrada neste trabalho (26,65 %), porém menor conteúdo de celulose (32,92 %) e maiores de lignina, cinzas e extrativos (28,62, 4,78 e 7,01 %, respectivamente).

A mistura de bagaço e palha de cana (1:1) foi submetida ao processo de hidrólise ácida diluída (item 5.2), visando a sacarificação da fração hemicelulósica e sua posterior fermentação. Após a hidrólise ácida das biomassas, duas frações distintas foram geradas, o hidrolisado hemicelulósico e a celulignina, a qual também foi caracterizada quanto a sua composição estrutural (Tabela 2). Com os dados apresentados, é possível observar uma diminuição do conteúdo de hemicelulose (25,40 para 13,69 %), evidenciando a remoção da hemicelulose durante o processo de hidrólise ácida diluída. Além disso, também foi possível observar o enriquecimento do conteúdo de celulose e lignina após a hidrólise ácida diluída das biomassas (37,52 para 49,72 % e 23,54 para 32,25 %, respectivamente). Tal enriquecimento abre precedentes para a aplicação da celulignina na produção de diferentes bioprodutos, sendo a produção de etanol de segunda geração a principal rota proposta para esta fração. Contudo, a celulignina pode ainda ser destinada para a produção de bioprodutos de maior valor agregado, como a nanocelulose, que possui aplicações em diferentes setores industriais, como na produção de reforços poliméricos em compósitos, filmes de revestimento, curativos, filtros de membrana para purificação de água, embalagens, adesivos e nas indústrias de papel, tecidos e eletrônicos. A lignina, por sua vez, pode ser utilizada como agente ligante e estabilizador de emulsões, além de ser destinada para a produção de bioprodutos de maior valor agregado, como polímeros, moléculas aromáticas, nanotubos e fibras de carbono, sistemas de liberação controlada de medicamentos, nanocompósitos e agentes de nanorevestimento antibacterianos, adesivos

de vedação de ferida, adsorventes UV e supercapacitores para armazenamento de energia (Candan et al., 2022)

A partir do balanço de massa realizado (Tabela 2), observa-se a conversão de 28,6 % do material carregado no reator de hidrólise a moléculas solúveis e um rendimento de sólidos equivalente a 71,4 %. Estes resultados se mostraram inferiores aos obtidos por Hernández-Pérez (2019), que empregou o mesmo reator de hidrólise e as mesmas condições operacionais utilizadas para este trabalho, obtendo um rendimento de sólidos equivalente a 55,99 % ao final do processo. Como discutido anteriormente, diferentes fatores podem afetar a composição química do bagaço e da palha de cana. Deste modo, as diferenças observadas entre os trabalhos podem decorrer desta variação. Além disso, durante a realização da hidrólise ácida diluída neste trabalho, o reator empregado apresentou alguns problemas técnicos, como aumento de pressão e vazamento na válvula de saída do hidrolisado, o que pode ter comprometido a eficiência da hidrólise. Ainda, segundo o balanço de massa, a eficiência de remoção de xilana foi de 58,9 %, que também se mostrou inferior à remoção observada por Hernández-Pérez (2019) (93,09 %), enquanto a remoção de grupos arabinosil e acetil foram de 74,7 e 70,1 %, respectivamente. A maior remoção destes constituintes provavelmente se deve à posição espacial na hemicelulose, onde aparecem como ramificações do esqueleto principal, sendo, portanto, mais suscetíveis à hidrólise. No caso da celulose e da lignina, não foram observadas remoções consideráveis durante a hidrólise, sendo estas equivalentes a 5,41 e 2,21 %, respectivamente. Tal comportamento era esperado, uma vez que a hidrólise ácida diluída visa a remoção da hemicelulose.

## **5.2 Obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana (1:1)**

A hidrólise ácida diluída da mistura de bagaço e palha de cana (1:1) teve por objetivo sacarificar a fração hemicelulósica destas biomassas, visando sua posterior bioconversão a xilitol por *C. tropicalis*. Após obtido, o hidrolisado hemicelulósico foi concentrado à vácuo, a fim de elevar sua concentração de xilose, e destoxificado, visando a redução do teor de inibidores. Os hidrolisados obtidos em cada uma destas etapas foram caracterizados quanto aos seus valores de pH e concentrações de açúcares e inibidores e os resultados são apresentados na Tabela 3. Nota-se que a xilose foi o principal carboidrato

constituente do hidrolisado hemicelulósico obtido, correspondendo a 79,45 % dos carboidratos, seguida pela glicose e pela arabinose, que apresentaram concentrações similares. A maior concentração de xilose se manteve para os hidrolisados concentrado e concentrado e destoxificado, assim como as concentrações de glicose e arabinose (Tabela 3). A maior presença de xilose no hidrolisado era esperada, uma vez que a hemicelulose de gramíneas, como a cana-de-açúcar, é classificada como glucuronoarabinoxilana. Este tipo de hemicelulose possui um esqueleto central constituído exclusivamente por resíduos de xilose ligados por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), além de resíduos de arabinose, ácido acético, ácido glicurônico e ácido 4-*O*-metil-glicurônico ramificados ao esqueleto central (Scheller e Ulvskov, 2010).

**Tabela 3.** Composição química do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1) obtido por hidrólise ácida diluída, concentrado à vácuo (FC = 5,5) e destoxificado.

| Composição química<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana (1:1) |               |               |
|---|--|---------------|---------------|
|   | Original   | Concentrado   | Destoxificado |
| Xilose                                    | 14,11 ± 0,11   | 77,55 ± 0,49  | 68,06 ± 0,14  |
| Glicose                                   | 1,80 ± 0,04  | 10,41 ± 0,40  | 10,08 ± 0,06  |
| Arabinose                                 | 1,85 ± 0,03  | 10,54 ± 0,39  | 11,07 ± 0,18  |
| Ácido acético                             | 2,27 ± 0,04  | 5,10 ± 0,17   | 4,75 ± 0,04   |
| Furfural                                  | 0,12 ± 0,00  | 0,02 ± 0,01   | 0,00 ± 0,00   |
| 5-HMF                                     | 0,11 ± 0,00  | 0,27 ± 0,00   | 0,19 ± 0,06   |
| Compostos fenólicos totais                | 2,52 ± 0,07  | 13,84 ± 0,37  | 4,13 ± 1,07   |
| Ácido 4-hidroxibenzóico                   | 0,007 ± 0,000  | 0,020 ± 0,002 | 0,023 ± 0,005 |
| Ácido ferúlico                            | 0,100 ± 0,001  | 0,239 ± 0,000 | 0,215 ± 0,089 |
| Ácido gálico                              | 0,011 ± 0,000  | 0,020 ± 0,000 | 0,022 ± 0,009 |
| Ácido <i>p</i> -cumárico                  | 0,070 ± 0,001  | 0,157 ± 0,001 | 0,088 ± 0,026 |
| Ácido vanílico                            | 0,013 ± 0,001  | 0,024 ± 0,000 | 0,030 ± 0,004 |
| Pirocatecol                               | 0,024 ± 0,002  | 0,058 ± 0,001 | 0,066 ± 0,016 |
| Siringaldeído                             | 0,086 ± 0,007  | 0,257 ± 0,003 | 0,209 ± 0,061 |
| Vanilina                                  | 0,018 ± 0,001  | 0,043 ± 0,000 | 0,037 ± 0,005 |
| <b>pH</b>                                 | 0,77 ± 0,02  | 0,13 ± 0,03   | 5,52 ± 0,02   |

Para a concentração do hidrolisado hemicelulósico obtido foi empregado um fator de concentração de 5,5 vezes, escolhido com base na concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico e na concentração necessária de xilose inicial nas fermentações, que deveria ser aproximadamente 65 gL<sup>-1</sup>. Todos os açúcares tiveram suas concentrações

elevadas proporcionalmente a esse fator de concentração. Após concentrado, o hidrolisado foi destoxificado para redução da concentração de inibidores e posterior utilização nas fermentações. Contudo, é possível observar a remoção parcial de xilose e glicose, que tiveram suas concentrações reduzidas em 12,24 e 3,17 %, respectivamente. Comportamento similar foi observado por Jofre (2019), que observou a redução de 12 % de xilose, 14 % de glicose e 8 % de arabinose após destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana (1:1) empregando a mesma metodologia utilizada neste trabalho. Nota-se também uma pequena elevação da concentração de arabinose após a destoxificação do hidrolisado, a qual pode estar associada a quebra de oligômeros e liberação de arabinose durante o processo de destoxificação. Ainda, para o hidrolisado concentrado e destoxificado, foi verificada uma proporção glicose:xilose de aproximadamente 1:6,75, a qual é descrita por Silva e Felipe (2006) como importante para a bioconversão de xilose em xilitol. Segundo estes autores, a alteração da proporção glicose:xilose de 1:25 para 1:5 acarretou no aumento do consumo de xilose e da produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 durante cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Em relação à proporção arabinose:xilose, esta foi de aproximadamente 1:6,15, contudo estudos ainda precisam ser realizados para analisar a influência da presença de arabinose na bioconversão de xilose em xilitol.

Hernández-Pérez (2019) e Jofre (2019), empregando as mesmas condições de hidrólise utilizadas neste trabalho, também relataram a obtenção de hidrolisados hemicelulósicos ricos em xilose a partir da mistura de bagaço e palha de cana (1:1). Enquanto Hernández-Pérez (2019) relatou a obtenção de um hidrolisado contendo 13,18 gL<sup>-1</sup> de xilose, 2,63 gL<sup>-1</sup> de arabinose e 1,44 gL<sup>-1</sup> de glicose, Jofre (2019) observou no hidrolisado obtido concentrações destes carboidratos de aproximadamente 17,9, 2,68 e 2,49 gL<sup>-1</sup>, respectivamente. Assim como para a composição das biomassas, variações nos níveis de carboidratos podem ocorrer devido à origem, à safra e a parâmetros de cultivo da cana, bem como à procedência das biomassas utilizadas. Além disso, a menor concentração de xilose no hidrolisado em comparação com outros trabalhos, pode estar relacionada à hidrólise parcial da hemicelulose com formação de oligossacarídeos (Hernández-Pérez, 2019), os quais não foram avaliados no presente trabalho. A predominância da xilose como principal açúcar constituinte também foi relatada para hidrolisados hemicelulósicos obtidos por hidrólise ácida diluída da palha de cevada (Moraes et al., 2018), palha de colza (López-Linares et al., 2018), espiga de milho (Cheng

et al., 2009), bagaço de cana (Arruda, 2011; Silva, 2006) e palha de cana (Hernández-Pérez et al., 2016) hidrolisados separadamente.

Inibidores da bioconversão de xilose em xilitol também foram observados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana (Tabela 3), sendo os compostos fenólicos obtidos em maior concentração ( $2,52 \text{ gL}^{-1}$ ). O valor encontrado no presente trabalho é intermediário aos relatados por Jofre (2019) e por Hernández-Pérez (2019) ( $1,50$  e  $3,38 \text{ gL}^{-1}$ , respectivamente) para o hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana (1:1) empregando as mesmas condições de hidrólise descritas neste trabalho. Silva-Fernandes et al. (2017) obtiveram  $3,37 \text{ gL}^{-1}$  de fenólicos totais após hidrólise ácida diluída do bagaço de cana, enquanto Hernández-Pérez (2015) relataram a presença de  $3,0 \text{ gL}^{-1}$  de fenólicos totais no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Após concentração à vácuo, o hidrolisado apresentou um aumento de aproximadamente 5,5 vezes na concentração de fenólicos totais, indicando que estes não foram volatilizados durante o processo de concentração. Os compostos fenólicos são considerados por alguns autores como os principais inibidores encontrados em hidrolisados hemicelulósicos, devido à sua alta toxicidade aos microrganismos, mesmo em baixas concentrações (Jönsson et al., 2013). Embora presente em altas concentrações no hidrolisado concentrado, a etapa de destoxificação reduziu a concentração destes inibidores para  $4,13 \text{ gL}^{-1}$ , correspondendo a uma remoção de 70,2 %.

Em relação à quantificação individual de fenólicos, ácido ferúlico, siringaldeído e ácido *p*-cumárico foram, respectivamente os compostos majoritários no HHBP (Tabela 3). A concentração de ácido ferúlico observada se origina dos ésteres de ferulato existentes entre a lignina e os grupos arabinofuranosil da hemicelulose da cana-de-açúcar. Ésteres de ácido *p*-cumárico também são descritos como abundantes na parede celular de gramíneas (Scheller e Ulvskov, 2010). Além destes fenólicos, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido gálico, ácido vanílico, pirocatecol e vanilina também foram observados no HHBP, porém em menores concentrações (Tabela 3). Além dos fenólicos identificados, também foi possível observar a presença de outros picos no cromatograma obtido (dados não apresentados) empregando a metodologia descrita no item 4.5.2, o que indica a presença de outros compostos fenólicos no HHBP que não foram identificados e quantificados no presente trabalho.

O ácido acético foi o segundo inibidor encontrado em maiores concentrações no hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana ( $2,27 \text{ gL}^{-1}$ ). Diferentemente dos compostos fenólicos, o teor de ácido acético não foi aumentado proporcionalmente ao fator

de concentração, sendo observado em  $5,10 \text{ gL}^{-1}$  no hidrolisado concentrado. Esse comportamento se deve a alta volatilidade deste ácido sob as condições de concentração empregadas (Silva-Fernandes et al., 2017). Hernández-Pérez (2019) também observou a presença de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana em concentração similar à obtida neste trabalho ( $2,02 \text{ gL}^{-1}$ ). No caso da utilização do bagaço de cana, concentrações similares de ácido acético também foram relatadas (Arruda et al., 2011; Silva-Fernandes et al., 2017), assim como para o uso da palha de cana (Hernández-Pérez et al., 2016). Em todos os casos, também não foram observados aumentos significativos da concentração de ácido acético após a concentração à vácuo. A destoxificação do HHBP concentrado reduziu a concentração deste inibidor em apenas 6,9 %. Resultados similares foram reportados por outros autores empregando a mesma metodologia de destoxificação utilizada neste trabalho. Jofre (2019) observou a remoção de 6,0 % do ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana concentrado, enquanto para Hernández-Pérez (2019), esta remoção foi de 8,1 %.

Furfural e 5-HMF também foram detectados no hidrolisado obtido, contudo, em menores concentrações ( $0,12$  e  $0,11 \text{ gL}^{-1}$ , respectivamente) (Jönsson et al., 2013; Rao et al., 2016). Suas concentrações se mostraram inferiores às reportadas como inibitórias para *C. guilliermondii* FTI 20037 (Kelly et al., 2008; Sanchez e Bautista, 1988) e *C. tropicalis* (Wang et al., 2017b; Wang et al., 2016) cultivadas em meio semidefinido contendo xilose como fonte de carbono. Após a concentração do hidrolisado, a concentração de furfural foi reduzida a  $0,02 \text{ gL}^{-1}$ , sendo esta redução associada à sua volatilidade sob as condições de concentração empregadas (Silva-Fernandes et al., 2017). Na etapa de destoxificação, este furano foi completamente removido (Tabela 3). A concentração de 5-HMF, por sua vez, foi aumentada durante a concentração à vácuo do HHBP, contudo, a etapa de destoxificação removeu 29,6 % do 5-HMF presente no hidrolisado concentrado. A redução de 41,0 e 56,0 % de 5-HMF foi reportada por Hernández-Pérez (2015) e Hernández-Pérez (2019), respectivamente, empregando a mesma metodologia utilizada neste trabalho.

Embora não avaliados no presente trabalho, a presença de íons metálicos também pode ser observada em hidrolisados hemicelulósicos. Ao concentrar o hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana (1:1) empregando fator de concentração de seis vezes, Hernández-Pérez (2019) relatou o aumento do teor de ferro, cromo, níquel e zinco, os quais foram observados em 3391,70, 292,3, 305,65 e  $15,05 \text{ mgL}^{-1}$ . Contudo, a destoxificação do hidrolisado concentrado empregando a mesma metodologia utilizada no



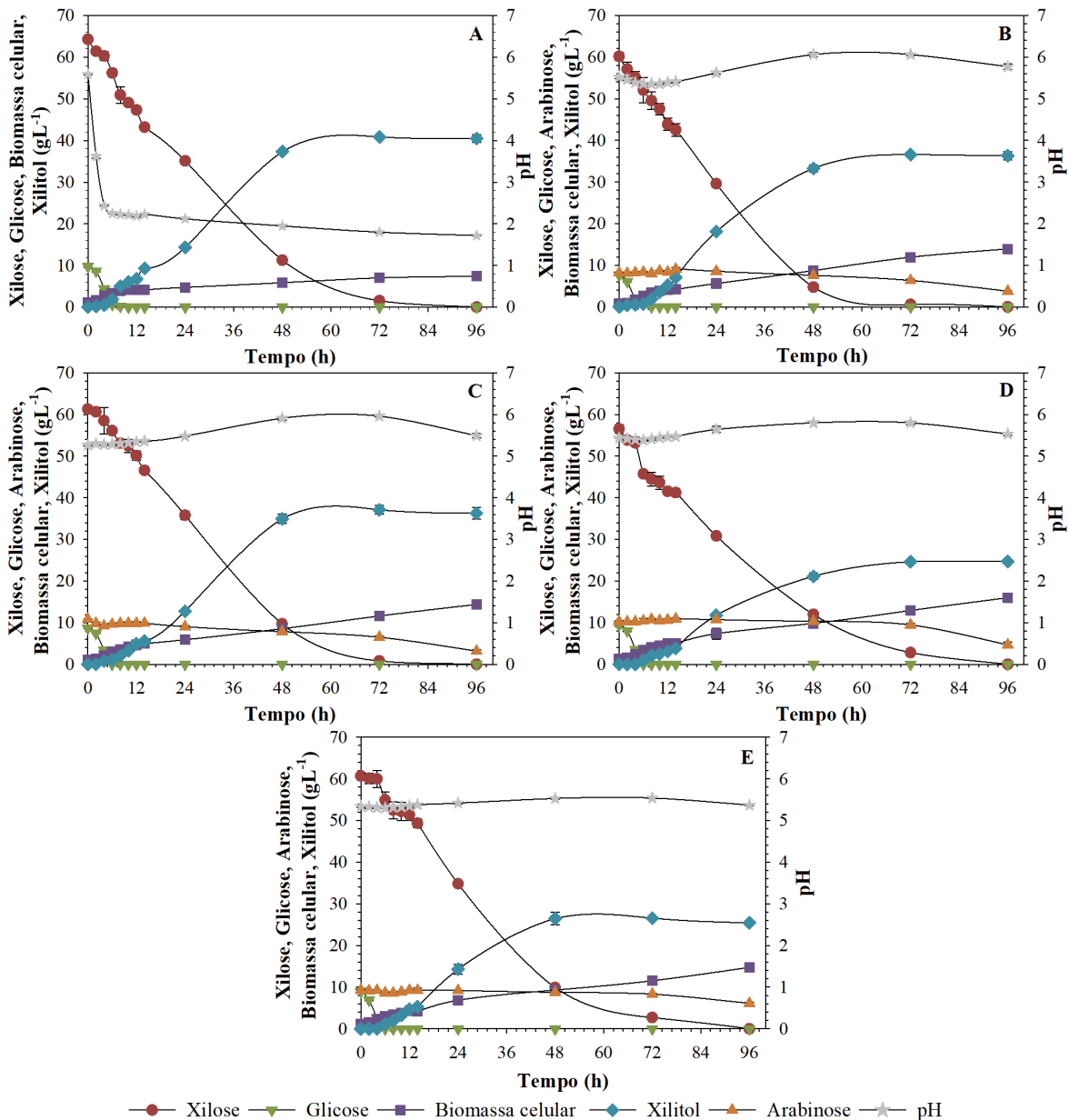
presente trabalho reduziu as concentrações destes íons para 3,00, 64,80, 114,55 e 0,85 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente. Algumas linhagens de *C. tropicalis* são tolerantes aos efeitos nocivos de íons metálicos, como cádmio, chumbo, zinco, níquel, cromo, mercúrio e outros. Linhagens de *C. tropicalis* resistentes a cádmio se mostraram tolerantes a zinco, níquel e cromo em concentrações de até 3100, 3000 e 2000 mgL<sup>-1</sup> (Rehman et al., 2007, 2010). Como hidrolisados lignocelulósicos podem reduzir o efeito nocivo de íons metálicos (Watson et al., 1984), acredita-se que as concentrações de íons metálicos no hidrolisado do presente trabalho não possuam efeitos tóxicos severos sobre o crescimento de *C. tropicalis* e sobre a bioconversão de xilose a xilitol.

### **5.3 Avaliação do efeito da adaptação do inóculo sob a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana**

O efeito negativo de inibidores de origem lignocelulósica na produção biotecnológica de xilitol é descrito para diferentes leveduras, como *Candida tropicalis* (Rao et al., 2006; S. Wang et al., 2015a), *Candida guilliermondii* (Bianchini et al., 2021b; Lima et al., 2004), *Kluyveromyces marxianus* (Albuquerque et al., 2015) e *Debaryomyces hansenii* (López-Linares et al., 2018). Para avaliar se a adaptação de *C. tropicalis* FTI 20037 poderia minimizar a toxicidade do HHBP, foram realizadas fermentações em meio semidefinido contendo glicose e xilose (fermentação 1), para avaliação da ausência de tóxicos sobre a performance fermentativa, e em meio formulado com HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (fermentação 2), inóculo adaptado ao hidrolisado concentrado e destoxificado (fermentação 3), inóculo adaptado ao hidrolisado original (fermentação 4) e inóculo adaptado ao hidrolisado concentrado (fermentação 5).

#### *5.3.1 Bioconversão de xilose em xilitol*

O meio semidefinido contendo glicose e xilose (proporção glicose:xilose 1:5), bem como o HHBP concentrado e destoxificado (proporção glicose:xilose de 1:6,75), foram suplementados com extrato de farelo de arroz, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e CaCl<sub>2</sub> para posterior fermentação e análise da bioconversão de xilose em xilitol por *C. tropicalis* FTI 20037. A Figura 7 apresenta os dados referentes ao consumo de açúcares, formação de biomassa celular, produção de xilitol e variação de pH ao longo de 96 h de fermentação.



**Figura 7.** Consumo de açúcares, formação de células e xilitol e variação de pH nas fermentações em meio semidefinido contendo glicose e xilose (A) e no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (B), adaptado ao hidrolisado concentrado e destoxificado (C), adaptado ao hidrolisado original (D) e adaptado ao hidrolisado concentrado (E).

Para todas as condições avaliadas, foi possível observar o esgotamento da glicose após 8 h, sendo este rápido consumo associado à sua baixa concentração nos meios de cultivo, bem como à presença constitutiva das enzimas associadas ao seu metabolismo. Nota-se, contudo, uma menor  $r_{G_{li}}$  na fermentação 2 ( $1,13 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , Tabela 4), considerando o período de 2 a 6 h de cultivo, no qual a fase de aceleração já havia terminado e a concentração de glicose não era limitante. As maiores  $r_{G_{li}}$ , por sua vez, foram observadas para as fermentações 4 e 1 ( $1,57$  e  $1,52 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectivamente), seguidas pelas

fermentações 5 e 3 (1,50 e 1,44  $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectivamente). Embora pareça ter ocorrido uma diminuição da velocidade de consumo de glicose pela presença dos inibidores ao se comparar as fermentações 1 e 2, e um aumento desta velocidade de consumo em função da adaptação ao hidrolisado (fermentações 2, 3, 4 e 5), não houveram diferenças estatisticamente significativas entre  $\mu_{\text{Gli}}$  para as condições avaliadas (Tukey,  $p < 0,05$ ), indicando que o consumo de glicose não foi afetado pelos inibidores e que não houveram melhorias pela adaptação ao hidrolisado. Tal comportamento pode estar relacionado à natureza constitutiva das enzimas associadas ao metabolismo de glicose que são expressas na célula independente das condições ambientais às quais levedura é exposta. Além disso, os mecanismos regulatórios associados ao consumo de glicose por *C. tropicalis* parecem não ter sido afetados pela presença dos inibidores presentes no HHBP, bem como pela adaptação da levedura.

**Tabela 4.** Velocidades volumétricas e específicas de consumo de glicose e xilose nas fermentações em meio semidefinido contendo glicose e xilose (1) e no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (2) e adaptado aos hidrolisados concentrado e destoxificado (3), original (4) e concentrado (5). Letras iguais em sobrescrito na mesma coluna não diferenciam estatisticamente as condições avaliadas (Tukey,  $p < 0,05$ ).

| Fermentações | Velocidades volumétricas<br>( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) |                              | Velocidades específicas<br>( $\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) |                              |
|--------------|---|------------------------------|--|------------------------------|
|              | Glicose   | Xilose                       | Glicose  | Xilose                       |
| 1            | 1,52 $\pm$ 0,05 <sup>acde</sup>                               | 1,00 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup> | 0,44 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>                                 | 0,17 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> |
| 2            | 1,13 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>                                  | 1,09 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup> | 0,43 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>                                 | 0,12 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> |
| 3            | 1,44 $\pm$ 0,01 <sup>ace</sup>                                | 1,12 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup> | 0,47 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>                                 | 0,13 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> |
| 4            | 1,57 $\pm$ 0,06 <sup>ade</sup>                                | 0,82 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup> | 0,46 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>                                 | 0,08 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup> |
| 5            | 1,50 $\pm$ 0,01 <sup>acde</sup>                               | 1,13 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> | 0,49 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>                                 | 0,14 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> |

Assim como a glicose, a xilose também foi consumida desde as primeiras horas de fermentação, porém em menores velocidades que a glicose (Tabela 4). Após a diminuição da concentração de glicose no meio, o consumo de xilose foi acelerado (Figura 7). Ao realizar fermentações em meio semidefinido contendo glicose e xilose (1:5) como fontes de carbono, Queiroz (2019) identificou a participação de duas proteínas transportadoras de xilose no proteoma da levedura utilizada no presente trabalho: *CtGXT2* e *CtXUT1*. Segundo o autor, a primeira proteína está relacionada ao transporte de glicose e xilose, sendo expressa desde o início da fermentação, porém em menores níveis. Já a segunda proteína está relacionada ao transporte de xilose, sendo expressa quando a glicose está ausente do meio e tendo mais que o dobro de expressão que a primeira proteína. Assim, o

perfil de expressão destas proteínas transportadoras auxilia no entendimento do perfil de absorção da xilose ao longo da fermentação, tanto do meio semidefinido quanto do HHBP.

Após 72 h de cultivo, o consumo de xilose se mostrou superior a 95 % para todas as condições avaliadas, sendo os maiores consumos observados para as fermentações 2 e 3 (99 e 98,7 %, respectivamente), seguidas das fermentações 1, 5 e 4 (97,9, 95,6 e 95 %, respectivamente). Após 96 h, a xilose foi completamente consumida em todas as condições avaliadas. No que diz respeito à  $r_s$ , sendo considerado o período de 12 a 48 h, no qual a assimilação de xilose ocorreu em velocidade máxima, foi observada uma maior velocidade de consumo para a fermentação 5 ( $1,13 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), enquanto a menor foi observada para a fermentação 4 ( $0,82 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). As fermentações 1, 2 e 3 apresentaram velocidades de consumo iguais a 1,00, 1,09 e  $1,12 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectivamente. Ao se comparar os valores de  $\mu_s$ , a maior e a menor velocidades observadas foram para a fermentação 1 ( $0,17 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) e para a fermentação 4 ( $0,08 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), respectivamente, sendo ambas estatisticamente diferentes das Fermentações 2, 3 e 5 (Tukey,  $p < 0,05$ ). Diferenças significativas não foram observadas no caso destas fermentações (Tukey,  $p < 0,05$ ). Estes resultados indicam que, ao contrário do que ocorreu para o consumo de glicose, a presença de inibidores no meio afetou negativamente o consumo de xilose pela levedura. Tal comportamento também é relatado para *C. tropicalis* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de palha (Wang et al., 2015b) e fibra de milho e bagaço de cana (Rao et al., 2006). É possível observar ainda que a adaptação ao hidrolisado não resultou em uma melhoria do consumo de xilose. É importante ressaltar que a adaptação realizada no presente trabalho foi de apenas um ciclo de 24 h, indicando que, para elevar a velocidade de consumo de xilose pelas células, mais ciclos de exposição ao hidrolisado devem ser realizados. Kim (2019) relatou um aumento da velocidade de consumo de xilose à medida que ciclos de adaptação ao hidrolisado de fibra de cacho de frutas de palmeira foram realizados.

Além do consumo de glicose e xilose, *C. tropicalis* também assimilou arabinose nas fermentações do HHBP. Diferente dos dois primeiros monossacarídeos, a arabinose foi lentamente consumida pela levedura ao longo das 96 h de cultivo (Figura 7), sendo o maior consumo observado para a fermentação empregando inóculo adaptado ao HHBP concentrado e destoxificado (70,7 %) e o menor para a fermentação empregando inóculo adaptado ao HHBP concentrado e não destoxificado (34,2 %). Diferenças estatísticas não foram observadas entre o consumo de arabinose nas fermentações 2 e 4, os quais foram 53,7 e 54,4 %, respectivamente (Tukey,  $p < 0,05$ ). Nota-se, ainda, um lento consumo desta

pentose na presença de xilose, sendo sua assimilação acelerada após a redução da concentração de xilose no meio (Figura 7). Para a fermentação empregando inóculo não adaptado, cerca de apenas 22,3 % de arabinose ( $1,83 \text{ gL}^{-1}$ ) foi consumida até 72 h de cultivo. Após este intervalo de tempo, e coincidindo com o esgotamento de xilose no meio, aproximadamente  $2,58 \text{ gL}^{-1}$  de arabinose foram consumidas em apenas 24 h, representando 31,4 % da arabinose inicial presente no meio. Este comportamento também é suportado pelo aumento de  $r_{\text{Ara}}$  e  $\mu_{\text{Ara}}$  (Tabela 5), que foram  $0,03 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e  $0,002 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$  (0 – 72 h) e  $0,11 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e  $0,008 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$  (72 – 96 h).

**Tabela 5.** Velocidades volumétricas e específicas de consumo de arabinose nas fermentações no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (2) e adaptado aos hidrolisados concentrado e destoxificado (3), original (4) e concentrado e não destoxificado (5). Letras iguais em sobrescrito na mesma coluna não diferenciam estatisticamente as condições avaliadas (Tukey,  $p < 0,05$ ).

| Fermentações | Velocidades volumétricas<br>( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) |                   | Velocidades específicas<br>( $\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) |                     |
|--------------|---|-------------------|--|---------------------|
|              | 0 a 72 h  | 72 a 96 h         | 0 a 72 h   | 72 a 96 h           |
| 2            | $0,03 \pm 0,00^a$   | $0,11 \pm 0,01^a$ | $0,002 \pm 0,000^{\text{ad}}$                                | $0,008 \pm 0,001^a$ |
| 3            | $0,06 \pm 0,00^b$   | $0,15 \pm 0,00^b$ | $0,005 \pm 0,000^b$  | $0,011 \pm 0,001^b$ |
| 4            | $0,01 \pm 0,00^c$   | $0,20 \pm 0,01^c$ | $0,001 \pm 0,000^{\text{cd}}$                                | $0,013 \pm 0,000^c$ |
| 5            | $0,01 \pm 0,00^c$   | $0,09 \pm 0,01^a$ | $0,001 \pm 0,000^{\text{acd}}$                               | $0,007 \pm 0,001^a$ |

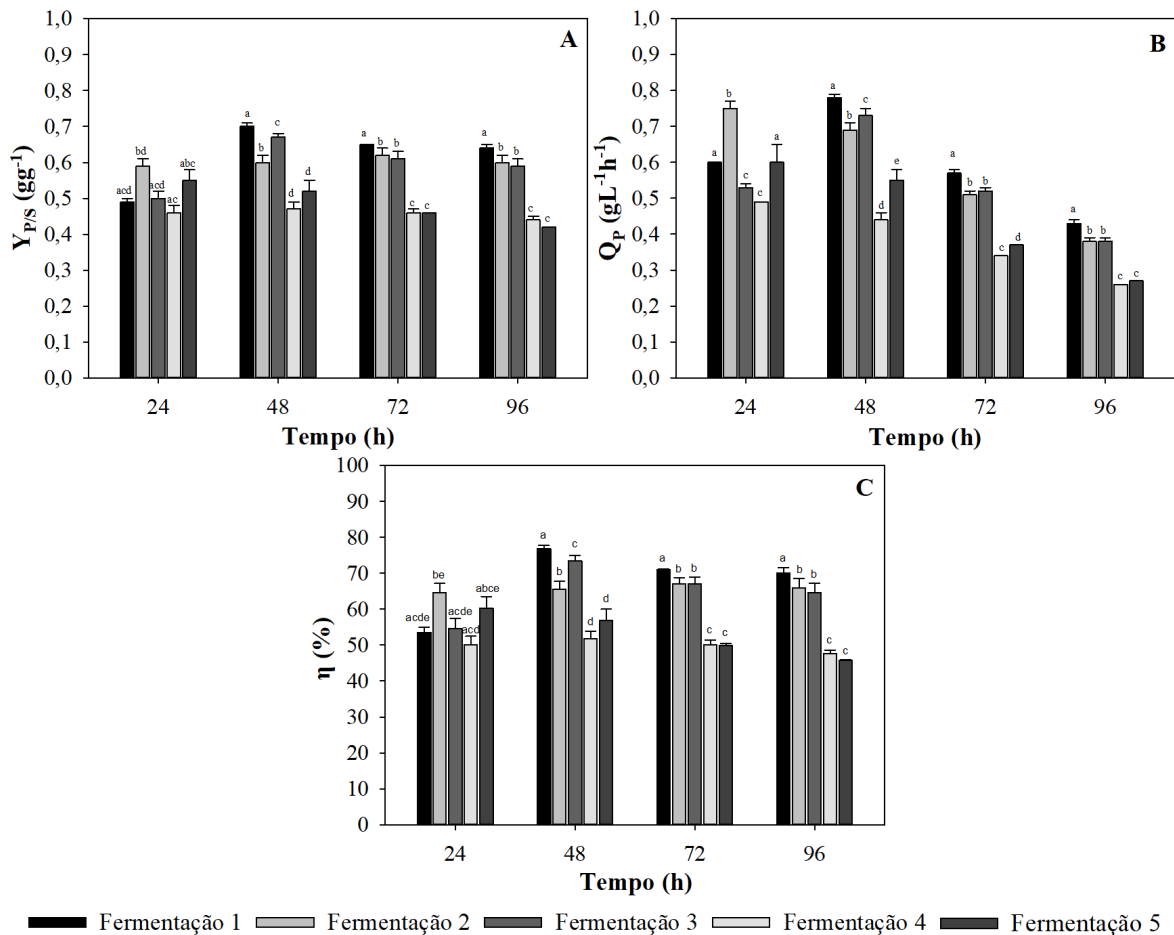
Este comportamento sugere a existência de uma repressão da assimilação de arabinose pela xilose, assim como observado por Oktaviani et al. (2021) para *C. tropicalis* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana. Segundo Fonseca et al. (2007), *Pichia guilliermondii* e *Candida arabinofementans* possuem transportadores de próton simporte de alta afinidade à arabinose que são inibidos pela xilose. Estas leveduras também possuem transportadores de arabinose de baixa afinidade que atuam por difusão facilitada e que não transportam esta pentose com grande velocidade. Estudos de expressão gênica de transportadores de arabinose de *K. marxianus*, *P. guilliermondii* (Knoshaug et al., 2015), *Penicillium chrysogenum* (Bracher et al., 2018) e *Arabidopsis thaliana* (Rottmann et al., 2018) em *S. cerevisiae* também evidenciam a inibição da assimilação de arabinose pela xilose. Recentemente, a presença de dois transportadores de arabinose e de enzimas associadas ao catabolismo desta pentose foi evidenciada por ferramentas de bioinformática no proteoma de *C. tropicalis* (Bianchini et al., 2021a), contudo estudos são necessários para entender o mecanismo de inibição da assimilação de arabinose pela xilose em *C. tropicalis*.

Para a fermentação com inóculo adaptado ao HHBP concentrado e destoxificado, foi observado o consumo de aproximadamente 40,1 % da arabinose inicial ( $4,35 \text{ gL}^{-1}$ ) nas primeiras 72 h de fermentação e de 33,4 % ( $3,63 \text{ gL}^{-1}$ ) nas últimas 24 h, indicando que a repressão catabólica da assimilação de arabinose pela xilose pode ser reduzida pela adaptação da levedura ao HHBP concentrado e destoxificado. Tal comportamento é, ainda, suportado pelo aumento de  $r_{\text{Ara}}$  e  $\mu_{\text{Ara}}$  em relação à fermentação empregando inóculo não adaptado, as quais foram  $0,06 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e  $0,005 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$  (0 – 72 h) e  $0,15 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e  $0,011 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$  (72 – 96 h). Oktaviani et al. (2021) também observaram o aumento do consumo de arabinose por *C. tropicalis* após a redução da concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana com uma proporção arabinose:xilose de aproximadamente 1:7. Os autores relataram, ainda, o efeito benéfico da adaptação da levedura no consumo de arabinose durante a fermentação do hidrolisado ao realizar a adaptação da levedura em meio formulado com 75 % de hidrolisado.

No caso da fermentação com inóculo adaptado ao HHBP original, um consumo de 7,2 % de arabinose foi observado nas primeiras 72 h de cultivo e 47,0 % nas últimas 24 h, além de  $r_{\text{Ara}}$  e  $\mu_{\text{Ara}}$  de  $0,01 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e  $0,001 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$  (0 - 72h) e  $0,20 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e  $0,013 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$  (72 - 96h). A partir destes dados, nota-se um maior consumo de arabinose nas últimas 24 h de fermentação, contudo não foi possível observar a redução da repressão catabólica do consumo de arabinose, como observado para a fermentação com inóculo adaptado ao HHBP concentrado e destoxificado. Para a fermentação com inóculo adaptado ao HHBP concentrado e não destoxificado, o consumo de arabinose nas primeiras 72 h foi de 10,4 %, enquanto nas últimas 24 h foi de 23,7 %. As velocidades de consumo foram iguais a  $0,01 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e  $0,001 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$  (0 – 72 h) e  $0,09 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e  $0,007 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$  (72 – 96 h). Para esta condição também foi observada a redução da repressão catabólica pela xilose, bem como o aumento do consumo de arabinose em relação à condição sem adaptação do inóculo.

No que diz respeito ao xilitol, bioproduto de interesse do presente trabalho, para todas as condições avaliadas, a produção de xilitol ocorreu lentamente nas primeiras 12 h, provavelmente devido à repressão catabólica da glicose sobre o metabolismo de xilose. Tal comportamento também foi relatado para *C. tropicalis* cultivada em meio semidefinido contendo glicose e xilose como fontes de carbono (Queiroz, 2019) e *C. guilliermondii* cultivada em meio semidefinido contendo xilose, glicose e arabinose e no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (Lima et al., 2004). A maior produção observada entre todas as condições avaliadas foi para a fermentação 1 após 72 h de cultivo ( $40,83 \text{ gL}^{-1}$ ,

Figura 7A), enquanto os maiores valores de  $Y_{P/S}$  ( $0,70 \text{ gg}^{-1}$ ),  $Q_P$  ( $0,78 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) e  $\eta$  (76,9 %) foram observados após 48 h para esta mesma condição (Figura 8). O consumo de xilitol por *C. tropicalis* não foi observado para todas as condições avaliadas, assim como relatado por outros autores (Cheng et al., 2009; Wang et al., 2017c; Wang et al., 2016).



**Figura 8.** Rendimento (A) e produtividade volumétrica de xilitol (B) e eficiência de conversão de xilose em xilitol das fermentações realizadas empregando inóculo adaptado e não adaptado. Letras iguais não diferenciam estatisticamente as condições avaliadas (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Para todas as fermentações no HHBP, as maiores produções de xilitol ocorreram após 72 h, sendo elas  $36,61$ ,  $37,10$ ,  $24,64$  e  $26,55 \text{ gL}^{-1}$  (Figuras 7B, 7C, 7D e 7E, respectivamente) para as fermentações empregando inóculo não adaptado, adaptado ao HHBP concentrado e destoxificado, adaptado ao HHBP e adaptado ao HHBP concentrado, respectivamente. Diferenças estatísticas entre a produção de xilitol nas fermentações com inóculo não adaptado e adaptado ao HHBP concentrado e destoxificado (fermentações 2 e 3, respectivamente) não foram observadas (Tukey,  $p < 0,05$ ). No entanto, os maiores valores de rendimento, produtividade volumétrica e eficiência de conversão de xilose em xilitol foram obtidos após 48 h de cultivo, sendo este tempo escolhido para comparação destes resultados. Ao se comparar as fermentações em meio semidefinido e no HHBP

concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado, é possível observar uma redução de 15,1 % no  $Y_{P/S}$  (0,70 para 0,60  $gg^{-1}$ ) e em  $\eta$  (76,87 para 65,23 %) e de 11,9 % em  $Q_P$  (0,78 para 0,69  $gL^{-1}h^{-1}$ ) (Figura 8). Nota-se também uma redução de 40,8 % na velocidade específica de produção de xilitol, que foi 0,13 e 0,08  $gg^{-1}h^{-1}$  nas fermentações 1 e 2, respectivamente. Todas estas diferenças foram significativas segundo o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Desse modo, estes resultados estão de acordo com o apresentado na literatura, que descreve a redução da produção de xilitol pela presença dos inibidores encontrados em hidrolisados hemicelulósicos. A produção de xilitol no HHBP se mostrou similar ao relatado para *C. tropicalis* W103 cultivada em hidrolisado hemicelulósico de espiga de milho, em que foi observada a produção, o rendimento e a produtividade volumétrica de xilitol de 40,5  $gL^{-1}$ , 0,63  $gg^{-1}$  e 0,54  $gL^{-1}h^{-1}$ , respectivamente, após 76 h de cultivo (Cheng et al., 2009). No presente trabalho, valores de  $Y_{P/S}$  e  $Q_P$  iguais a 0,62  $gg^{-1}$  e 0,51  $gL^{-1}h^{-1}$ , respectivamente, foram observados após 72 h de cultivo no HHBP concentrado e destoxificado.

Entre as fermentações no HHBP, os maiores valores de  $Y_{P/S}$ ,  $Q_P$  e eficiência de conversão foram obtidos empregando inóculo adaptado ao HHBP concentrado e destoxificado (0,67  $gg^{-1}$ , 0,73  $gL^{-1}h^{-1}$  e 73,5 %, respectivamente) após 48 h de cultivo (Figura 8). Quando estes parâmetros fermentativos obtidos após 48 h de fermentação são comparados, é possível observar que a adaptação ao HHBP aumentou significativamente  $Y_{P/S}$  e  $\eta$  (13,3 %) e  $Q_P$  (7,1 %) (Figura 8). Além disso, um aumento estatisticamente significativo de 9,7 % em  $\mu_P$  (0,08 para 0,09  $gg^{-1}h^{-1}$ ) também foi observado. Oktaviani et al. (2021) observaram os efeitos benéficos da adaptação de *C. tropicalis* sob a produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, sendo também observado o aumento do rendimento de xilitol e a eficiência de conversão de xilose em xilitol. Segundo Rao et al. (2006), existe uma correlação entre o número de ciclos de adaptação de *C. tropicalis* e o rendimento de xilitol, sendo observado um aumento constante do rendimento de xilitol com o aumento dos ciclos de adaptação, tanto para o hidrolisado de espiga de milho quanto para o de bagaço de cana.

Em relação às fermentações com inóculo adaptado ao HHBP original e concentrado, foram observadas reduções nos parâmetros fermentativos de xilitol e na velocidade específica de produção de xilitol em relação ao cultivo no HHBP com inóculo não adaptado. Enquanto para  $Y_{P/S}$  e  $\eta$  estas reduções foram de 20,6 e 12,9 %, respectivamente, para  $Q_P$  as reduções foram de 35,8 e 19,6 %, respectivamente. As



reduções em  $\mu_P$  em relação à fermentação empregando inóculo não adaptado foram de 42,8 e 22,7%, respectivamente. Nota-se, ainda, uma tendência de redução de  $Q_P$  após 48 h de cultivo para todas as fermentações, bem como a manutenção do rendimento de xilitol a valores próximos, assim como reportado por Oktaviani et al. (2021). Os dados referentes à produção de xilitol empregando inóculo adaptado e não adaptado evidenciam a importância de destoxificar o hidrolisado a ser empregado na etapa de adaptação a fim de promover efeitos positivos sobre a produção de xilitol.

Ao empregar meio formulado com 75 % de hidrolisado hemicelulósico de palha de cana na etapa de adaptação de *C. tropicalis*, Oktaviani et al. (2021) observou o desenvolvimento de um fenótipo mais tolerante, que contribuiu mais significativamente para o desempenho na produção de xilitol do que pela adaptação empregando 50 % de hidrolisado. Segundo os autores, a utilização de uma maior proporção de hidrolisado e, conseqüentemente, de uma maior concentração de inibidores pode desencadear o desenvolvimento de um fenótipo mais tolerante mais rapidamente do que o uso de uma menor proporção. Tal comportamento pode explicar as diferenças na produção de xilitol entre as fermentações 3 e 4. No caso da fermentação 5, a alta concentração de inibidores presente na etapa de adaptação pode ter levado a danos celulares em *C. tropicalis*, induzindo-as a um caminho inverso do acontecido na fermentação 3. Importante ressaltar que no trabalho de Oktaviani e colaboradores, os inibidores detectados no hidrolisado, ácido acético e compostos fenólicos, estavam presentes em concentrações muito inferiores às descritas no presente trabalho (0,77 e 0,14  $\text{gL}^{-1}$ ). Além disso, a presença de íons metálicos nos hidrolisados original e concentrado também pode ter contribuído para a redução da performance fermentativa de *C. tropicalis*.

Em relação à biomassa celular, foi observada uma menor concentração de células na fermentação do meio semidefinido em relação às fermentações no HHBP. Enquanto na fermentação 1 foram formadas 7,43  $\text{gL}^{-1}$  de biomassa celular após 96 h de fermentação, nas fermentações 2, 3, 4 e 5 foram formadas 13,94, 14,38, 15,99 e 13,65  $\text{gL}^{-1}$  respectivamente, correspondendo a uma redução que variou de 83,7 a 115,2 %. A menor concentração de biomassa celular no cultivo em meio semidefinido em relação às fermentações nos hidrolisados pode ser justificado por dois fatores: a maior disponibilidade de nutrientes e fontes de carbono no HHBP, que pode ter contribuído para a maior produção de células, e a queda brusca do pH na fermentação 1, que não ocorreu nas fermentações do HHBP devido à capacidade tamponante dos hidrolisados hemicelulósicos e pode ter inibido o crescimento de *C. tropicalis*. Segundo Rodrigues et al.

(2006), a dissociação parcial de ácidos fracos presentes em hidrolisados hemicelulósicos, como os ácidos acético, fórmico e levulínico, pode conferir alta capacidade tamponante a hidrolisados com valores de pH de até 5,5, como os utilizados no presente trabalho. Enquanto na fermentação do meio semidefinido o pH atingiu 2,19 após apenas 12 h de cultivo, o menor valor de pH atingido após esse tempo no HHBP foi 5,34 na fermentação 3, evidenciando a capacidade tamponante do hidrolisado. Após este tempo, o pH do meio semidefinido continuou caindo até 1,72 ao final da fermentação, enquanto no HHBP nota-se uma tendência de elevação do pH de 14 h até 72 h de cultivo. Após isso, observa-se um leve decréscimo do pH nas últimas 24 h de fermentação.

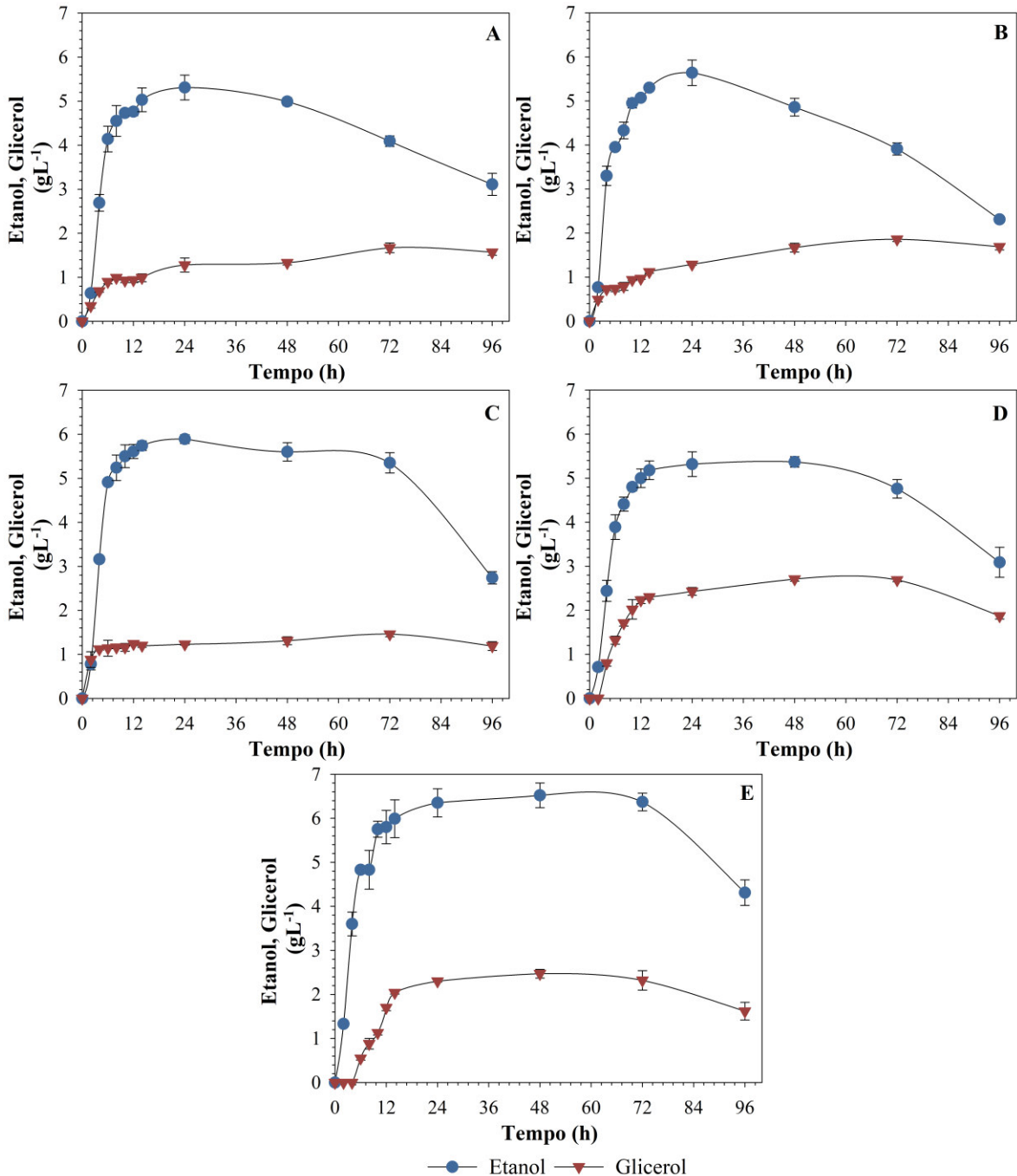
Nota-se que a drástica redução do pH ocorreu concomitantemente ao intenso metabolismo de glicose nas primeiras horas de fermentação. Tal comportamento pode estar relacionado com a produção de ácidos orgânicos a partir da glicose, contudo a produção de ácidos ao longo da fermentação não foi avaliada no presente trabalho. A rápida redução do pH do meio também foi relatada por Queiroz (2019), que observou a queda brusca do pH nas primeiras horas de cultivo em meio semidefinido não tamponado contendo glicose e xilose como fontes de carbono. No caso das fermentações do HHBP, o aumento do pH observado ao longo da fermentação está relacionado ao consumo de ácido acético pela levedura, tema melhor discutido no item 5.3.3. O aumento do pH em virtude do consumo de ácido acético em hidrolisados hemicelulósicos também foi relatado para *C. tropicalis* em (Li et al., 2012b; Oktaviani et al., 2021; Ping et al., 2013) e para *C. guilliermondii* (Bianchini et al., 2021b; Felipe et al., 1997; Hernández-Pérez, 2015; Lima et al., 2004; Rodrigues et al., 2006) em outros estudos.

Deste modo, a menor presença de nutrientes e fontes de carbono e a drástica redução do pH do meio semidefinido podem ser os responsáveis pela menor produção de biomassa celular e pelas menores velocidades específicas de crescimento observadas da fermentação 1. Para todas as condições avaliadas, duas fases exponenciais de crescimento foram observadas, sendo a primeira associada ao consumo de glicose e a segunda ao consumo de xilose. Desse modo, é possível observar o crescimento diáuxico de *C. tropicalis*, tanto em meio semidefinido quanto no HHBP, uma vez que a maquinaria responsável pela assimilação de xilose não é constitutiva, sendo requerido um período para expressão das proteínas associadas ao catabolismo da xilose. Desse modo, há uma fase lag após o esgotamento de glicose para expressão das proteínas necessárias para a assimilação de xilose por *C. tropicalis* (Wang et al., 2017c). Para a fase de crescimento associada ao

consumo de glicose, a menor velocidade específica de crescimento foi observada empregando inóculo adaptado hidrolisado concentrado ( $0,115 \text{ h}^{-1}$ ), enquanto a maior foi observada para a fermentação com inóculo não adaptado ( $0,247 \text{ h}^{-1}$ ). Para as fermentações em meio semidefinido e com inóculo adaptado ao HHBP concentrado/destoxificado e original, as velocidades observadas foram  $0,176$ ,  $0,206$  e  $0,176 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. No caso do crescimento associado ao consumo de xilose, a menor velocidade específica de crescimento foi observada para a fermentação em meio semidefinido ( $0,008 \text{ h}^{-1}$ ), enquanto a maior foi observada para a fermentação com inóculo não adaptado ( $0,016 \text{ h}^{-1}$ ). Para as fermentações com inóculo adaptado aos HHBP concentrado/destoxificado, original e concentrado, as velocidades observadas foram  $0,014$ ,  $0,012$  e  $0,010 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Não houve diferenças estatisticamente significativas na velocidade específica de crescimento associada ao consumo de xilose nas fermentações em HHBP, sendo observadas diferenças significativas apenas entre a fermentação 1 e as fermentações 2 e 3 (Tukey,  $p < 0,05$ ).

### 5.3.2 Produção dos subprodutos etanol e glicerol

Além da produção de xilitol, *C. tropicalis* também produziu etanol e glicerol em todas as condições avaliadas (Figura 9). Para a maioria das condições, a maior produção de etanol ocorreu após 24 h de cultivo, exceto para a fermentação com inóculo adaptado ao HHBP concentrado, em que a maior produção foi observada após 48 h, sendo esta também a maior produção de etanol entre as condições avaliadas ( $6,52 \text{ gL}^{-1}$ ). Após estes intervalos de tempo, notou-se uma diminuição da concentração de etanol no meio para todas as condições avaliadas, provavelmente devido ao seu consumo pela levedura. O consumo de etanol como fonte de carbono também foi observado para *C. guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço (Bianchini et al., 2021b) e de palha de cana (Hernández-Pérez, 2015) e para *C. tropicalis* cultivada em meio semidefinido contendo glicose (Queiroz, 2019).



**Figura 9.** Produção e consumo de etanol e glicerol nas fermentações em meio semidefinido contendo glicose e xilose (A) e no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (B), adaptado ao hidrolisado concentrado e destoxificado (C), adaptado ao hidrolisado original (D) e adaptado ao hidrolisado concentrado e não destoxificado (E).

Ao analisar a Figura 9, observa-se a rápida produção de etanol associada ao consumo de glicose nas primeiras seis horas de fermentação para todas as condições avaliadas. Após este intervalo de tempo observou-se uma diminuição da velocidade de produção de etanol, que pode ser visualizada a partir das velocidades volumétricas e específicas de produção de etanol (Tabela 6). Esta redução pode estar associada à produção

de etanol a partir da xilose, que é destinada principalmente para a produção de xilitol por *C. tropicalis*. Além disso, como já comentado, o metabolismo de xilose depende da expressão de enzimas não constitutivas, o que pode ter contribuído para a redução da produção de etanol. Ao se comparar as velocidades específicas de produção de etanol nos tempos de 8 a 24 h, nota-se uma redução significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ) da velocidade específica na fermentação com inóculo adaptado ao HHBP concentrado e destoxificado (fermentação 3) em relação à fermentação com inóculo não adaptado, a qual pode estar associada ao aumento da produção de xilitol na fermentação 3. Deste modo, células adaptadas ao HHBP estariam direcionando a xilose para a produção de xilitol ao invés de etanol. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as fermentações 4 e 5 e a fermentação com inóculo não adaptado (Tabela 6).

**Tabela 6.** Velocidades volumétricas e específicas de produção de etanol para as fermentações em meio semidefinido contendo glicose e xilose (1) e no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (2) e adaptado aos hidrolisados concentrado e destoxificado (3), original (4) e concentrado e não destoxificado (5). Letras iguais em sobrescrito na mesma coluna não diferenciam estatisticamente as condições avaliadas (Tukey,  $p < 0,05$ ).

| Fermentações | Velocidades volumétricas de produção de etanol |                         | Velocidades específicas de produção de etanol |                         |
|--------------|--|-------------------------|---|-------------------------|
|              | 2 a 6h   | 8 a 24h                 | 2 a 6h  | 8 a 24h                 |
| 1            | $0,87 \pm 0,08^{acde}$                         | $0,05 \pm 0,02^{abcd}$  | $0,25 \pm 0,02^{abde}$                        | $0,01 \pm 0,00^{abcde}$ |
| 2            | $0,80 \pm 0,02^{acde}$                         | $0,08 \pm 0,01^{abcde}$ | $0,30 \pm 0,02^{abce}$                        | $0,02 \pm 0,00^{abcde}$ |
| 3            | $1,03 \pm 0,04^b$                              | $0,04 \pm 0,02^{abcd}$  | $0,34 \pm 0,01^{bce}$                         | $0,01 \pm 0,00^{acd}$   |
| 4            | $0,80 \pm 0,08^{acde}$                         | $0,06 \pm 0,02^{abcde}$ | $0,23 \pm 0,02^{ad}$                          | $0,01 \pm 0,00^{abcd}$  |
| 5            | $0,88 \pm 0,02^{acde}$                         | $0,10 \pm 0,02^{bde}$   | $0,29 \pm 0,02^{abce}$                        | $0,02 \pm 0,00^{abe}$   |

Assim como para o etanol, a produção de glicerol também foi observada desde as primeiras horas de fermentação para todas as condições avaliadas (Figura 9). A formação de glicerol a partir das primeiras horas de cultivo também foi relatada para *S. cerevisiae* submetida a estresses por aquecimento, sorbitol e etanol (Li et al., 2009). O glicerol é uma molécula osmoprotetora comumente produzida por leveduras sob condições estressantes, como estresses oxidativo, osmótico, por aquecimento (Duskova et al., 2015) e pela presença de inibidores encontrados em hidrolisados hemicelulósicos (Bianchini et al., 2021b). Além de osmorregulador, a biossíntese de glicerol atua na regeneração do cofator  $NAD^+$ , atuando na manutenção do balanço redox da célula (Guo e Olsson, 2014).

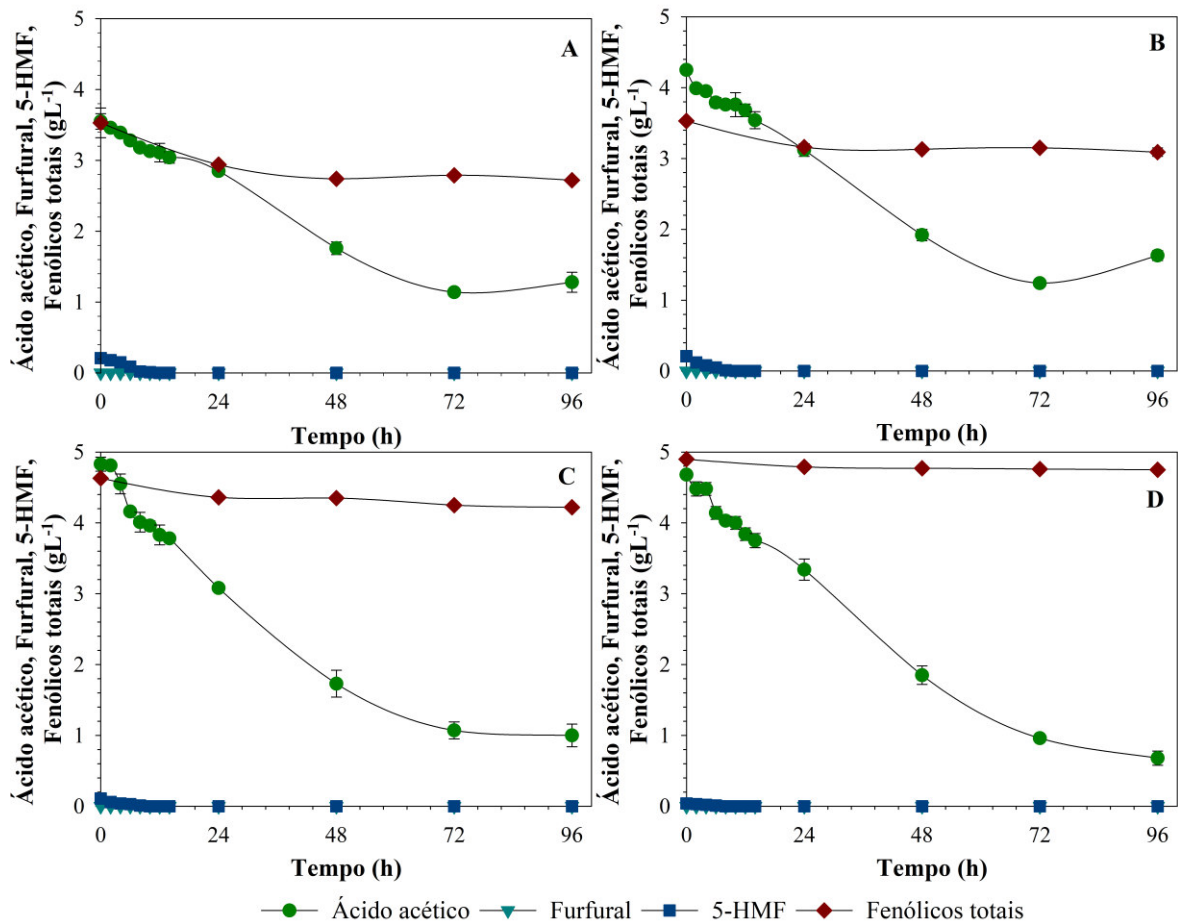
Dentre as condições avaliadas, as maiores produções de glicerol foram observadas para as fermentações 4 e 5 ( $2,71$  e  $2,47 \text{ gL}^{-1}$ , respectivamente) após 48 h de fermentação, seguido das fermentações 2, 1 e 3 ( $1,86$ ,  $1,67$  e  $1,46 \text{ gL}^{-1}$ , respectivamente) após 72 h de fermentação (Figura 9). Após estes intervalos de tempo, observou-se o consumo de glicerol

para todas as condições exceto para a fermentação em meio semidefinido, que não apresentou consumo significativo de glicerol após 72 h de fermentação. Foi possível observar diferenças significativas entre a produção de glicerol na fermentação 1 e nas fermentações 2 e 3, quando comparados estatisticamente. Contudo, comparando-se todas as outras condições não foram observadas diferenças significativas (Tukey,  $p < 0,05$ ). A adaptação de *C. tropicalis* ao hidrolisado concentrado e destoxificado (fermentação 3) reduziu a produção de glicerol em 21,5 % em relação à fermentação empregando inóculo não adaptado. Deste modo, esta condição adaptativa parece ter proporcionado uma maior tolerância da levedura ao HHBP. Contudo, nota-se que a utilização do HHBP e do HHBP concentrado/não destoxificado (fermentações 4 e 5, respectivamente) na etapa de adaptação aumentou a produção de glicerol em 45,7 e 32,8 %, respectivamente. Este resultado, aliado à menor produção de xilitol nestas duas fermentações, corrobora com a hipótese de que a destoxificação do hidrolisado é importante para a promoção de efeitos positivos sobre a produção de xilitol pela levedura. Em relação à fermentação 1, embora não houvesse inibidores no meio de cultivo que fornecessem estresse às células, a redução do pH no início da fermentação e sua manutenção em valores baixos podem ter provocado estresse ácido na levedura, levando a uma maior produção de glicerol.

### 5.3.3 Variação da concentração de inibidores

A variação da concentração de inibidores – ácido acético, furfural, 5-HMF e compostos fenólicos – ao longo das fermentações também foi avaliada no presente trabalho, sendo os resultados apresentados na Figura 10. Para o ácido acético, os maiores consumos observados foram nas fermentações 5 e 4 após 96 h de cultivo, nas quais 85,4 e 79,1 % do ácido acético presente no hidrolisado foi consumido por *C. tropicalis*. Para as fermentações 2 e 3, o maior consumo observado foi após 72 h de fermentação (67,9 e 70,9 %, respectivamente), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre estes consumos. Nota-se ainda, nas fermentações 2 e 3, um aumento da concentração de ácido acético no período de 72 a 96 h de cultivo (Figura 10). Tal comportamento é condizente com a diminuição do pH para este intervalo de tempo nestas duas fermentações e pode significar uma mudança no metabolismo de *C. tropicalis* nas últimas 24 h, acarretando na produção de ácido acético pela levedura. O consumo de ácido acético por *C. tropicalis* foi descrito em meio semidefinido e em hidrolisado hemicelulósico de espiga de milho (Cheng

et al., 2009). Segundo os autores, *C. tropicalis* consumiu 50 % do ácido acético disponível no meio semidefinido contendo xilose e ácido acético como fontes de carbono após 50 h de fermentação. O consumo no hidrolisado de espiga de milho também ocorreu, porém, a quantificação deste consumo não foi informada.



**Figura 10.** Variação das concentrações de ácido acético, furfural, 5-HMF e fenólicos totais ao longo das fermentações no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (A), adaptado ao hidrolisado concentrado e destoxificado (B), adaptado ao hidrolisado original (C) e adaptado ao hidrolisado concentrado e não destoxificado (D).

O metabolismo de ácido acético por microrganismos pode ser realizado pela sua incorporação no ciclo do ácido tricarboxílico ou no ciclo do glioxilato, dependendo do microrganismo e de seu estado fisiológico e metabólico (Palma et al., 2018), sendo *C. tropicalis* uma levedura capaz de metabolizar este ácido orgânico. O consumo de ácido acético por *C. tropicalis* foi descrito em meio semidefinido e hidrolisados hemicelulósicos de palha de cana (Oktaviani et al., 2021) e espiga de milho (Cheng et al., 2009; Li et al., 2012b; Ping et al., 2013). Nestes estudos, o consumo de ácido acético foi atrelado ao aumento de pH do meio. Oktaviani et al. (2021) observaram o consumo de  $0,77 \text{ gL}^{-1}$  de ácido acético após 24 h de fermentação, acompanhado pelo aumento do pH de 5,0 para 6,3.

Ping et al. (2013) relataram, para o hidrolisado hemicelulósico de espiga de milho, o consumo total do ácido acético presente no hidrolisado ( $4,18 \text{ gL}^{-1}$ ), enquanto Li et al. (2012b) relataram o consumo deste ácido e o aumento do pH de 5,5 para 6,7 ao longo da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de espiga de milho. O consumo de ácido acético também foi descrito para *C. guilliermondii* em meio semidefinido contendo xilose e glicose como fontes de carbono (Felipe et al., 1995) e nos hidrolisados de bagaço (Arruda, 2011) e de palha (Hernández-Pérez, 2015).

Em relação aos furanos, as fermentações no HHBP iniciaram sem a presença de furfural, uma vez que este foi totalmente removido na etapa de destoxificação (Tabela 3). Para o 5-HMF, verificou-se uma concentração inicial de  $0,21 \text{ gL}^{-1}$  nas fermentações 2 e 3,  $0,11 \text{ gL}^{-1}$  na fermentação 4 e  $0,04 \text{ gL}^{-1}$  na fermentação 5, sendo totalmente consumido após 12 h de cultivo na fermentação 2, 10 h nas fermentações 3 e 4 e após 8 h na fermentação 5 (Figura 10). O consumo mais rápido nas fermentações 4 e 5 pode estar relacionado à menor concentração de 5-HMF. Para as fermentações 2 e 3, que apresentavam a mesma concentração inicial de 5-HMF, houve um consumo mais rápido deste furano empregando inóculo adaptado ao HHBP concentrado e destoxificado, indicando que o consumo de furanos pode ser aumentando pela adaptação celular de *C. tropicalis*. O metabolismo de furanos por microrganismos inicia pelas suas reduções aos seus derivados álcoois ou oxidação a ácidos, sendo esta conversão acoplada ao consumo de NADH e NADPH. Em seguida, estes derivados são degradados em ácidos orgânicos e metabolizados pela célula (Liu, 2011; Taherzadeh e Karimi, 2011). A conversão mais comumente observada para os furanos são suas reduções aos seus derivados álcoois. Segundo Taherzadeh e Karimi (2011), o 5-HMF é convertido principalmente a seu derivado álcool, o 2,5-*bis*-hidroximetilfurano, havendo uma baixa taxa de conversão ao seu derivado ácido. Este comportamento foi observado para *S. cerevisiae*, que produziu quantidades significativas de 2,5-*bis*-hidroximetilfurano a partir do 5-HMF, mas não do derivado ácido (Liu et al., 2004).

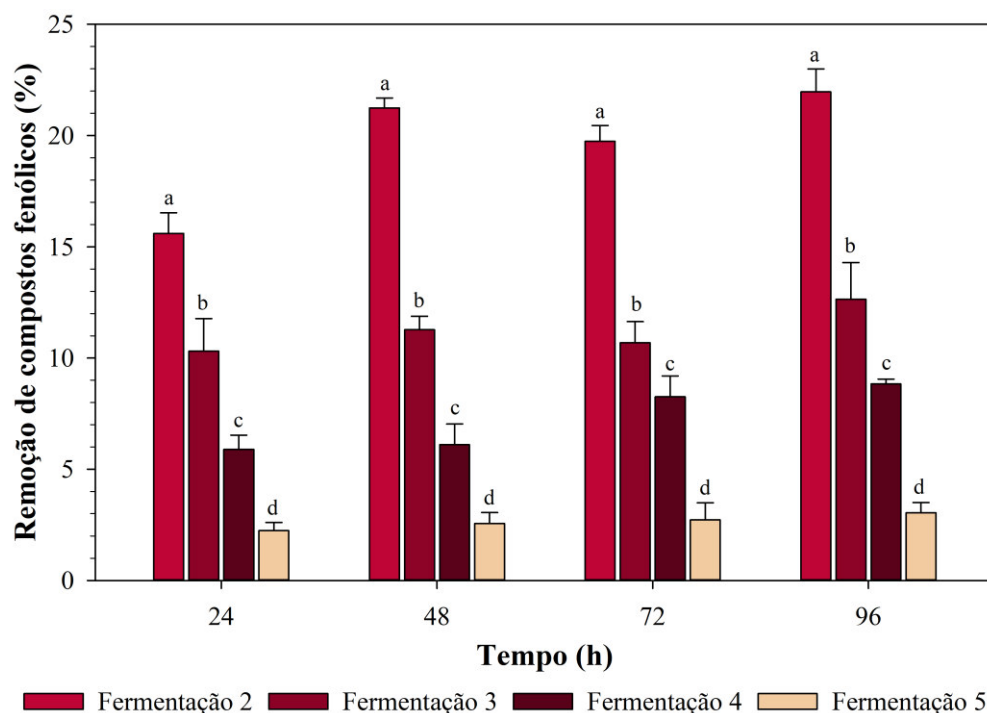
*C. tropicalis* é uma levedura que apresenta altas taxas de consumo de furfural, sendo este comportamento demonstrado por Wang et al. (2017c). Os autores observaram o consumo de  $3 \text{ gL}^{-1}$  de furfural pela levedura após 1 h de cultivo em meio semidefinido contendo xilose, enquanto nos meios semidefinidos contendo glicose e glicose/xilose, o consumo total de furfural ocorreu após 2 h de fermentação. Wang et al. (2016) também relataram o rápido consumo de  $7 \text{ gL}^{-1}$  de furfural por *C. tropicalis* após 3 h de cultivo em



meio semidefinido contendo xilose. O consumo de furfural por *C. tropicalis* leva à um desbalanço redox da célula, acarretando no aumento do consumo de xilose e na diminuição da produção de xilitol, uma vez que a conversão de xilitol a xilulose leva a produção de NADH, cofator empregado na redução do furfural a seu respectivo derivado álcool (Wang et al., 2017c). Comportamento similar foi observado por Ask et al. (2013), que observaram a redução do acúmulo de xilitol quando *S. cerevisiae* recombinante foi cultivada em furfural e 5-HMF. A redução do furfural ao seu derivado álcool por *C. tropicalis* é realizada pela enzima álcool desidrogenase 1, que é expressa na presença de furfural e inibida em sua ausência (Wang et al., 2017c; Wang et al., 2016). Para *S. cerevisiae*, identificou-se que furfural e 5-HMF podem ser reduzidos por álcool desidrogenases dependentes de NADH (Laadan et al., 2008). Acredita-se que no presente trabalho, o 5-HMF foi reduzido à 2,5-*bis*-hidroximetilfurano por álcool desidrogenases de *C. tropicalis* e consumido como fonte de carbono. Acredita-se, também, que assim como observado para *C. acetobutylicum* (Zhang et al., 2012) e *S. cerevisiae* (Ask et al., 2013), a velocidade de conversão de 5-HMF por *C. tropicalis* é menor que a de conversão de furfural. Tal comportamento pode estar associado a uma menor toxicidade do 5-HMF e à necessidade de eliminar primeiro o inibidor mais tóxico. Segundo Sanchez e Bautista (1988), *C. guilliermondii* cultivada em meio semidefinido contendo glicose como fonte de carbono apresentou uma menor inibição do crescimento na presença de 5-HMF do que na presença de furfural. Enquanto 0,2 % (m/v) de furfural inibiu 100 % o crescimento da levedura, a mesma concentração de 5-HMF levou a uma redução de 61,7 %.

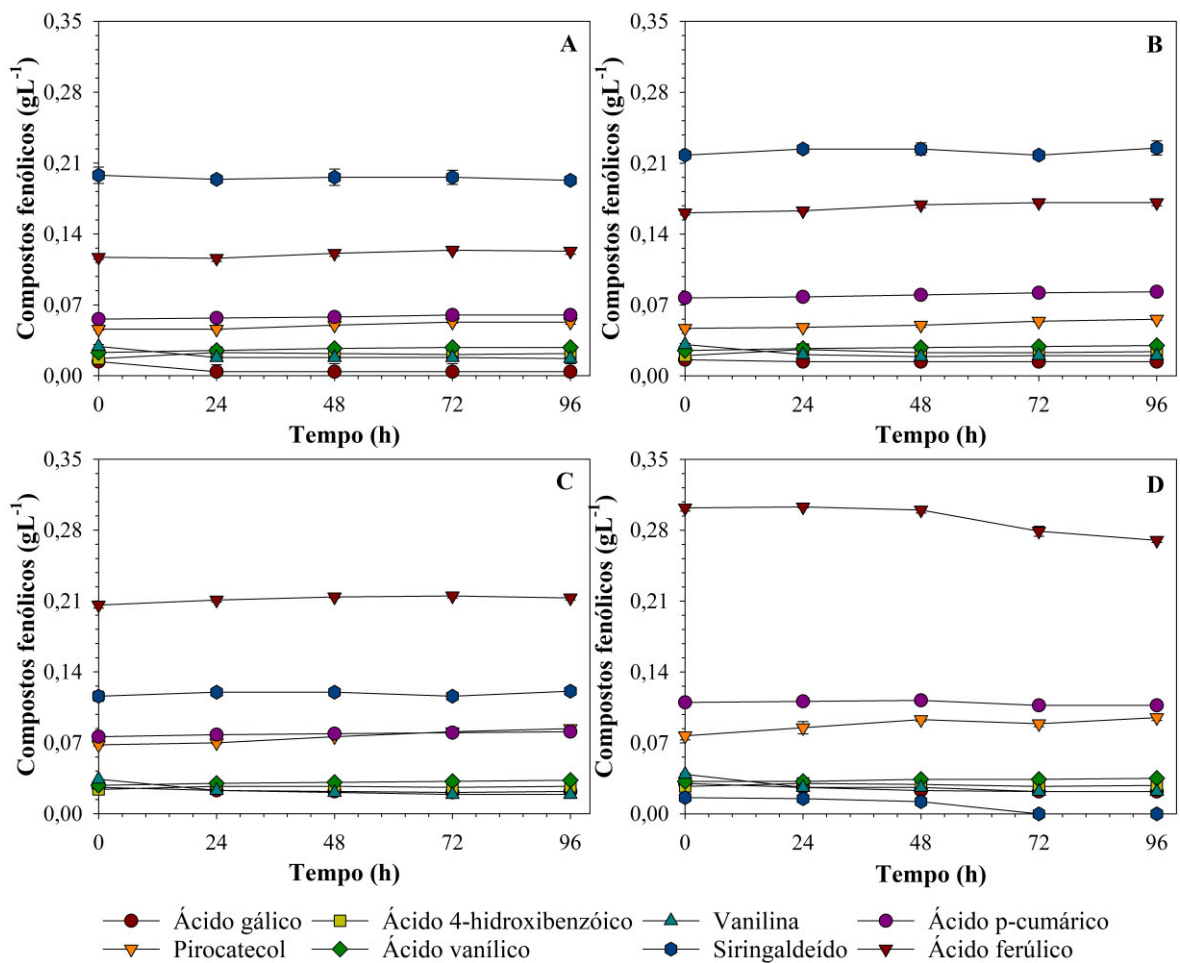
Em relação aos compostos fenólicos totais, também foi observada a redução de suas concentrações em todas as fermentações no HHBP, porém em diferentes proporções (Figura 11). A maior redução de compostos fenólicos foi observada para a fermentação 2 após 96 h de cultivo (0,81 gL<sup>-1</sup>, 22,0 %), não havendo, contudo, diferenças significativas nesta redução de 48 a 96 h (Tukey,  $p < 0,05$ ). Deste modo, a redução da concentração de compostos fenólicos por *C. tropicalis* na fermentação 2 ocorreu apenas nas primeiras 48 h de cultivo. Tal comportamento também foi observado para *C. guilliermondii* não adaptada cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana (1:1), que reduziu a concentração de fenólicos em 24,8 e 32,3 % em fermentações do hidrolisado destoxificado com carvão ativado e biomassa seca de levedura, respectivamente (Jofre et al., 2021). Os autores ainda relataram a redução de 27,0 % dos fenólicos presentes no hidrolisado ao realizar a destoxificação a 30 °C e 24 h, corroborando com a redução de fenólicos observada na fermentação 2. Para as fermentações 3 e 5, as maiores reduções foram

observadas após 96 h de fermentação (0,41 e 0,15 gL<sup>-1</sup>, 12,6 e 3,0 %, respectivamente), não havendo diferenças significativas entre todos os tempos avaliados. No caso da fermentação 4, a maior remoção também foi observada após 96 h (0,39 gL<sup>-1</sup>, 8,83 %), não havendo diferença estatística entre a remoção de fenólicos entre 72 e 96 h.



**Figura 11.** Redução da concentração de compostos fenólicos ao longo das fermentações no HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (Fermentação 2), adaptado ao hidrolisado concentrado e destoxificado (Fermentação 3), adaptado ao hidrolisado original (Fermentação 4) e adaptado ao hidrolisado concentrado e não destoxificado (Fermentação 5). Letras iguais não diferenciam estatisticamente as condições avaliadas (Tukey,  $p < 0,05$ ).

A redução da concentração de compostos fenólicos durante a fermentação do HHBP pode estar associada ao metabolismo destes inibidores pela levedura, como evidenciado para a vanilina e siringaldeído por *C. guilliermondii* (Cortez e Roberto, 2010), ácido ferúlico, aldeído coniferílico e ácido *p*-cumárico por *S. cerevisiae* (Adeboye et al., 2015), fenol e 2,6-dimetilfenol por *C. tropicalis* (Phalgune et al., 2013) e fenol, *m*-cresol, benzoato, tolueno, *o*-cresol e 4-clorofenol por *Candida albicans* (Wang et al., 2009). De fato, diferentes espécies de leveduras são capazes de metabolizar essa classe de compostos. No presente trabalho, também se avaliou o consumo dos oito compostos fenólicos identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana ao longo das 96 h de fermentação em HHBP (Figura 12).



**Figura 12.** Variação da concentração de ácido gálico, pirocatecol, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico, vanilina, siringaldeído, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico ao longo das fermentações em HHBP concentrado e destoxificado empregando inóculo não adaptado (A), adaptado ao hidrolisado concentrado e destoxificado (B), adaptado ao hidrolisado original (C) e adaptado ao hidrolisado concentrado e não destoxificado (D).

Para a fermentação 2, não foram observadas reduções significativas nos teores dos fenólicos analisados, exceto para a vanilina, que apresentou uma redução de 37,9 % após 24 h de fermentação. Após este intervalo de tempo, não foram observadas reduções significativas na concentração de vanilina (Tukey,  $p < 0,05$ ). Na fermentação 3, observou-se uma redução de 8,51 e 34,0 % no teor de ácido gálico e vanilina, respectivamente, nas primeiras 24 h de cultivo, não havendo variação desta redução após este período. Não houve reduções significativas nas concentrações de todos os outros fenólicos ao longo do tempo de fermentação (Tukey,  $p < 0,05$ ). Comportamento similar foi observado para a fermentação 4, em que se observou o consumo de 15,6 e 44,1 % de ácido gálico e vanilina, respectivamente, após 96 h de cultivo. Por fim, para a fermentação 5, observou-se o consumo total de siringaldeído após 72 h e a redução em 42,7 % no teor de vanilina e em 10,4% no teor de ácido ferúlico após 96 h de cultivo. Nota-se que a concentração de

siringaldeído no meio de cultivo desta fermentação ( $0,016 \text{ gL}^{-1}$ ) era inferior às concentrações das outras fermentações ( $0,116 - 0,218 \text{ gL}^{-1}$ ), o que pode ter contribuído para o favorecimento de seu consumo total nesta condição.

Em um estudo sobre o consumo de fenólicos por *C. tropicalis*, Middelhoven (1993) analisou a assimilação de 7 mg de diferentes compostos fenólicos como única fonte de carbono. Segundo os autores, a levedura assimilou e apresentou crescimento quando cultivada em fenol, catecol, resorcinol e hidroquinona. A degradação de fenol por *C. tropicalis* ocorre pela via do  $\beta$ -cetoadipato, sendo as enzimas fenol 2-monooxigenase e catecol 1,2-dioxigenase importantes para este processo. Enquanto a primeira enzima catalisa a conversão de fenol a catecol, a segunda converte catecol a *cis,cis*-muconato, que então é metabolizado pela levedura (Wang et al., 2020b). Na presença de ácido gálico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, a levedura não apresentou crescimento, indicando a sua incapacidade de assimilar estes compostos. Além disso, *C. tropicalis* também não foi capaz de assimilar outros fenólicos comumente encontrados em hidrolisados hemicelulósicos, como ácido cafeico, ácido sinápico e ácido protocatecóico (Middelhoven, 1993). Cooper e Land (1979) também observaram a incapacidade de *C. tropicalis* de assimilar ácido 4-hidroxibenzóico e ácido protocatecóico em meio semidefinido contendo estes ácidos como única fonte de carbono. Os autores analisaram o consumo destes fenólicos por 58 linhagens de *C. tropicalis*, observando a incapacidade de assimilação por 100 % das linhagens. Menna (1959) relatou a incapacidade de *C. tropicalis* em assimilar ácido ferúlico, 4-hidroxibenzaldeído e vanilina e utilizar estes fenólicos como fonte de carbono. Estes resultados corroboram com a incapacidade de *C. tropicalis* em assimilar os compostos fenólicos analisados no presente trabalho. É possível que os compostos que tiveram suas concentrações reduzidas ao longo das fermentações tenham sido adsorvidos na parede celular da levedura e não assimilados como fonte de carbono.

A redução da concentração de fenólicos totais ao longo das fermentações observada na Figura 11 pode estar associada à adsorção destes inibidores na parede celular da levedura, como evidenciado para a adsorção de compostos fenólicos na parede celular de *C. guilliermondii* (Jofre et al., 2021), e de aflatoxina B1 (Pereyra et al., 2018) e do corante *Reactive Orange 16* (Kim et al., 2015) na parede celular de *S. cerevisiae*. Um comportamento interessante observado para todas as condições adaptativas realizadas foi a menor redução de fenólicos totais quando empregado inóculo adaptado ao HHBP,

independentemente de suas características químicas (Figura 11). A menor redução na concentração de compostos fenólicos quando empregado inóculo adaptado aos hidrolisados pode estar associada a alterações adaptativas na parede celular da levedura. Pereyra et al. (2018) relataram, para *S. cerevisiae* cultivada em extrato solúvel de grãos secos de destilaria, uma maior adsorção de aflatoxina B1 do que para a levedura cultivada em meio semidefinido contendo glicose como fonte de carbono, sendo este comportamento associado ao aumento do conteúdo de carboidratos e da espessura da parede celular (Pereyra et al., 2018). Segundo Yiannikouris et al. (2006), a adsorção de micotoxinas à parede celular de *S. cerevisiae* está correlacionada a quantidade de D-glucanas e de quitina.

A modificação da composição e da arquitetura da parede celular em função da adaptação aos hidrolisados pode ter ocorrido no presente trabalho, resultando nos resultados de redução de compostos fenólicos totais observados nas fermentações em HHBP (Figura 11). Segundo Wang et al. (2020b), *C. tropicalis* cultivada na presença de  $2,0 \text{ gL}^{-1}$  de fenol apresentou um aumento na expressão de genes envolvidos na biossíntese de quitina a partir de glicose, bem como a inibição de genes envolvidos na degradação deste polímero, resultando em seu acúmulo na parede celular. Testes de susceptibilidade da parede celular evidenciaram, ainda, o aumento da resistência de *C. tropicalis* ao estresse provocado pela presença de fenol. O acúmulo de quitina pode ter levado ao remodelamento da parede celular, promovendo uma resposta adaptativa e levando ao aumento da resistência das células ao estresse, prevenindo a entrada de fenol nas células e reduzindo a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio.

Em relação à fermentação em meio semidefinido, a drástica redução do pH nas primeiras horas de cultivo também pode ter induzido alterações na parede celular de *C. tropicalis*. A adaptação a ambientes ácidos provoca a reorganização da parede celular de leveduras, dependendo da espécie, podendo levar à descamufagem da quitina e ao desmascaramento de  $\beta$ -glucanas, levando à exposição desses polissacarídeos na superfície da parede celular. *C. tropicalis* cultivada em ambiente moderadamente ácido (pH 4,0) apresentou uma reorganização da parede celular e desmascaramento de  $\beta$ -glucanas, enquanto *S. cerevisiae* mascarou a  $\beta$ -glucana de sua parede celular. Para *Candida krusei* este processo ocorreu em ambiente alcalino (pH 8,0), enquanto *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis* não demonstraram nenhuma modulação de  $\beta$ -glucanas dependente de pH (Sherrington et al., 2017). Os autores ainda relataram a exposição de quitina e  $\beta$ -glucanas na superfície da parede celular de *C. albicans* quando cultivada em pH 2,0 e 4,0. Segundo eles, em ambientes fortemente ácidos (pH 2,0) ocorre a biossíntese e a

descamufagem de quitina e o desmascaramento de  $\beta$ -glucanas e em pH moderadamente ácido (4,0) ocorre apenas a exposição de quitina e  $\beta$ -glucanas na superfície da parede celular.

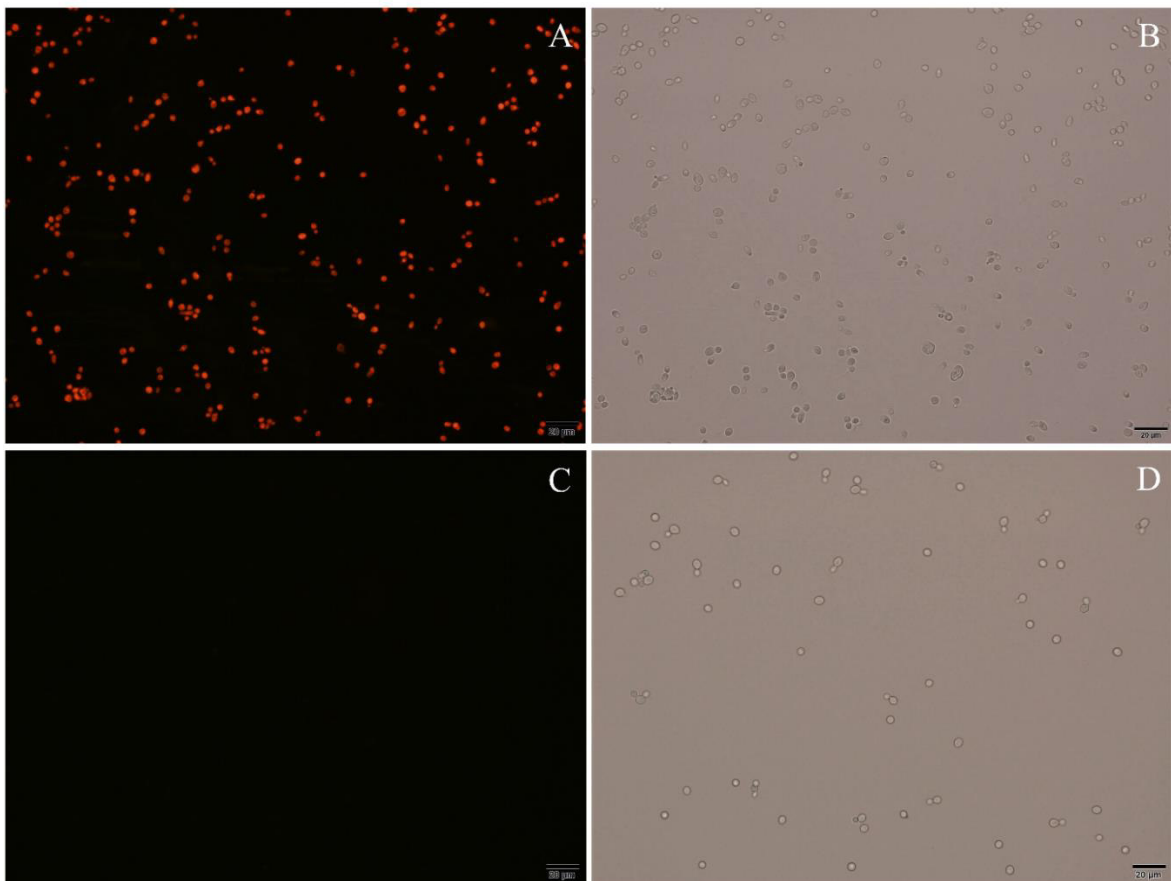
Além de alterações na parede celular, uma outra possível resposta adaptativa que pode ter contribuído para a menor redução de fenólicos totais nas fermentações 3, 4 e 5 é a superexpressão de sistemas ativos de transporte envolvidos no efluxo de compostos citotóxicos e a manutenção destes compostos em baixas concentrações intracelularmente. Estes sistemas contribuem para a manutenção da viabilidade celular mesmo em condições de estresse. Wang et al. (2020b) relataram a superexpressão de transportadores das famílias MFS e ABC quando *C. tropicalis* foi cultivada na presença de 0,5 a 2,0 gL<sup>-1</sup> de fenol, sendo observado também um aumento da expressão com a elevação da concentração de fenol no meio. Segundo os autores, 14 genes pertencentes às famílias MFS e ABC foram altamente expressos na presença de fenol, havendo um aumento drástico de 169 vezes na expressão do gene CTRG\_00385, que codifica um transportador da família MFS. Para *S. cerevisiae*, foi demonstrado que a presença destes transportadores conferiram maior tolerância a uma série de compostos lipofílicos, como vanilina, alcanos e ácido acético (Sá-Correia e Godinho, 2022).

Embora não avaliadas no presente trabalho, alterações na composição e arquitetura da parede celular de *C. tropicalis* e a expressão de sistemas ativos de transporte de xenobióticos parecem ser pontos importantes e passíveis de regulação pela célula, de modo a aumentar a tolerância aos inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos. Assim, é importante que pesquisas futuras visem o entendimento do efeito destes inibidores frente a estas estruturas subcelulares.

#### **5.4 Avaliação do efeito do HHBP sob a integridade de membrana plasmática de *C. tropicalis***

Embora diferentes estudos reportem o efeito perturbador dos inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos sob a integridade da membrana plasmática de microrganismos (Guo e Olsson, 2014; Rao et al., 2016; Sikkema et al., 1995), até o presente momento não há estudos, em nosso conhecimento, que reportem o efeito global de hidrolisados hemicelulósicos frente esta estrutura subcelular, sendo todos os estudos realizados em meio semidefinido contendo os inibidores de interesse. Deste modo, no

presente trabalho, o efeito do HHBP em sua totalidade sob a integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* foi avaliado pela coloração das células com iodeto de propídeo e visualização em microscópio de fluorescência. Ao se comparar a fluorescência emitida (células vermelhas) para o controle positivo (Figura 13A) com o campo claro da lâmina (Figura 13B), é possível observar que todas as células foram coradas pelo iodeto de propídeo, evidenciando o rompimento da membrana plasmática pelo processo de esterilização úmida, bem como a eficiência deste fluoróforo na determinação da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis*. Além disso, o controle negativo da análise sem a presença do fluoróforo (Figura 13C e 13D) evidenciou que *C. tropicalis* não emite autofluorescência nas condições definidas para a análise realizada.

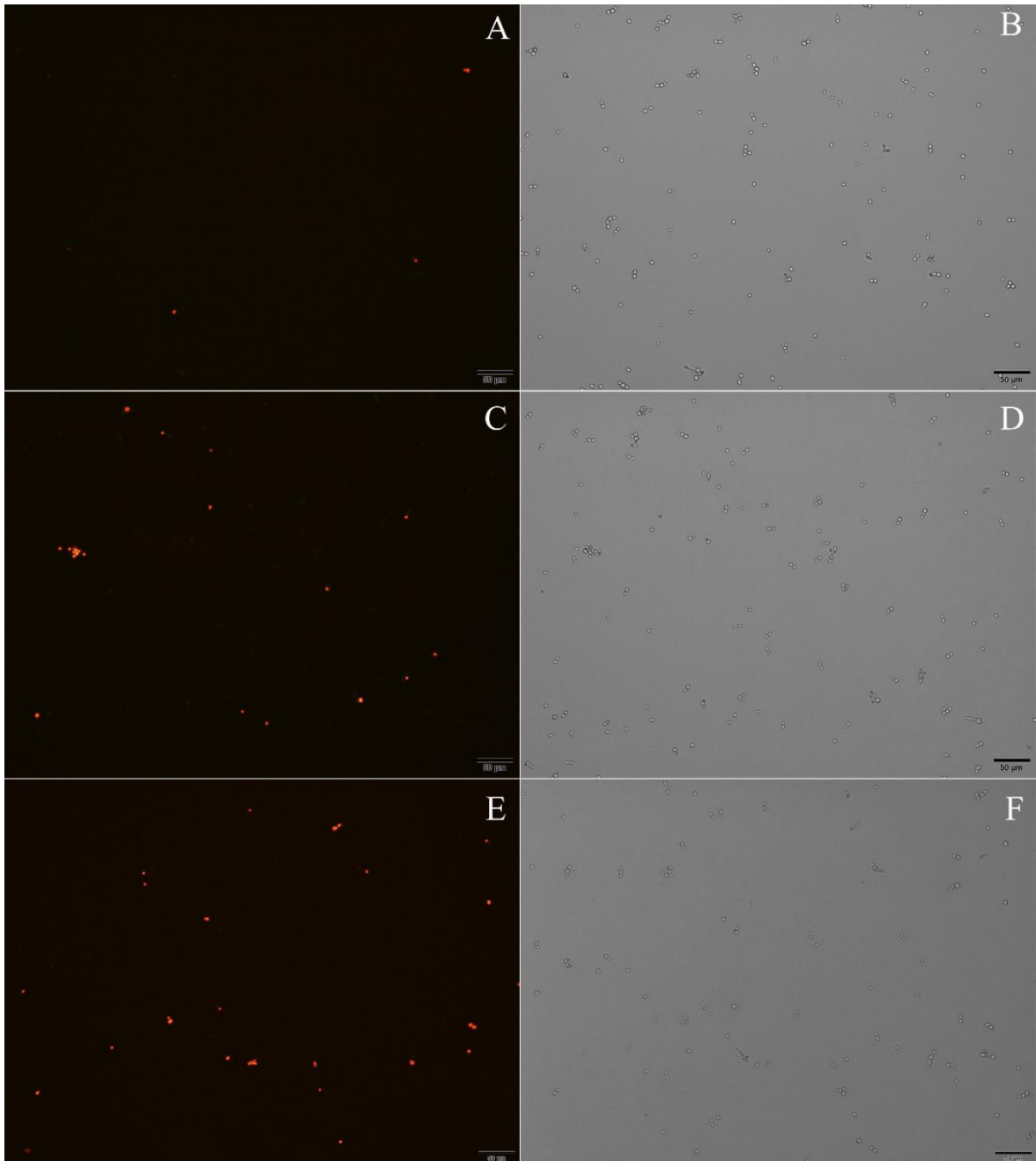


**Figura 13.** Micrografias do controle positivo da análise de integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* autoclavada a 115 °C por 15 min (A) e campo claro do controle positivo (B). Autofluorescência (controle negativo) de *C. tropicalis* sem adição do iodeto de propídeo (C) e campo claro do controle negativo (D). Visualização no microscópio de fluorescência aplicando um aumento de 400X.

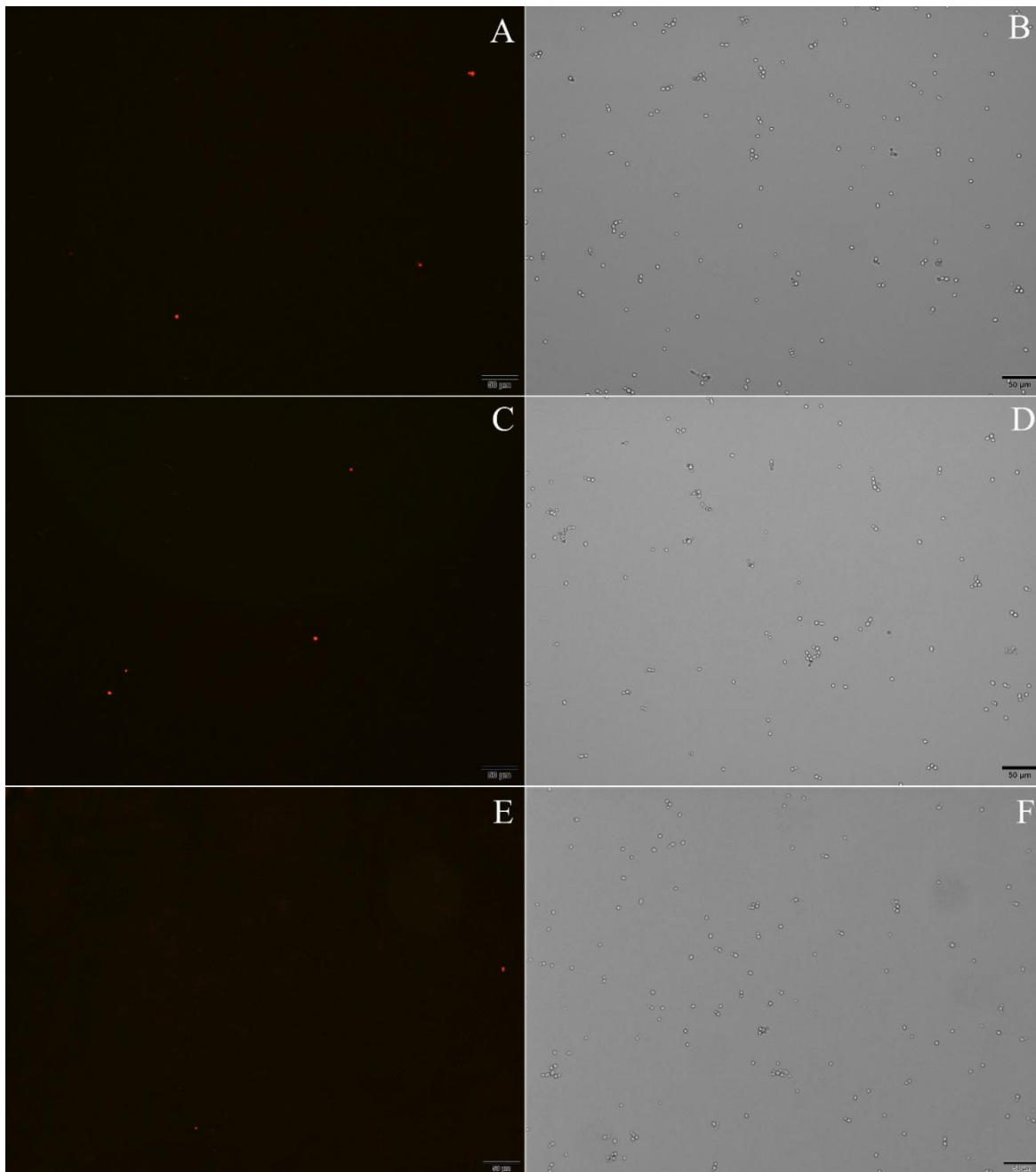
Em relação às fermentações realizadas neste trabalho, observou-se uma maior proporção de células coradas pelo iodeto de propídeo após 24 e 48 h de cultivo na fermentação em meio semidefinido (Figura 14) que nas fermentações do HHBP

independente da adaptação do inóculo (Figura 15-18), indicando que a integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* foi mais afetada na fermentação do meio semidefinido. Tal comportamento divergiu do esperado, uma vez que devido ao efeito perturbador da integridade da membrana plasmática descrito na literatura para os inibidores de origem lignocelulósica, esperava-se uma maior proporção de células coradas nas fermentações do HHBP. Estes resultados podem ser associados à queda brusca do pH nas primeiras horas de fermentação no meio semidefinido (Figura 7), que gerou um impacto mais negativo sob a integridade da membrana de *C. tropicalis* nos tempos analisados do que a presença dos inibidores no meio de fermentação. Além disso, os tempos escolhidos para a análise podem ter sido inadequados, uma vez que leveduras possuem mecanismos de tolerância aos inibidores de origem lignocelulósica. Estes mecanismos podem ter sido ativados nas primeiras horas de fermentação, levando a uma maior resistência de *C. tropicalis* aos inibidores nas fermentações no HHBP após 24 e 48 h de fermentação.

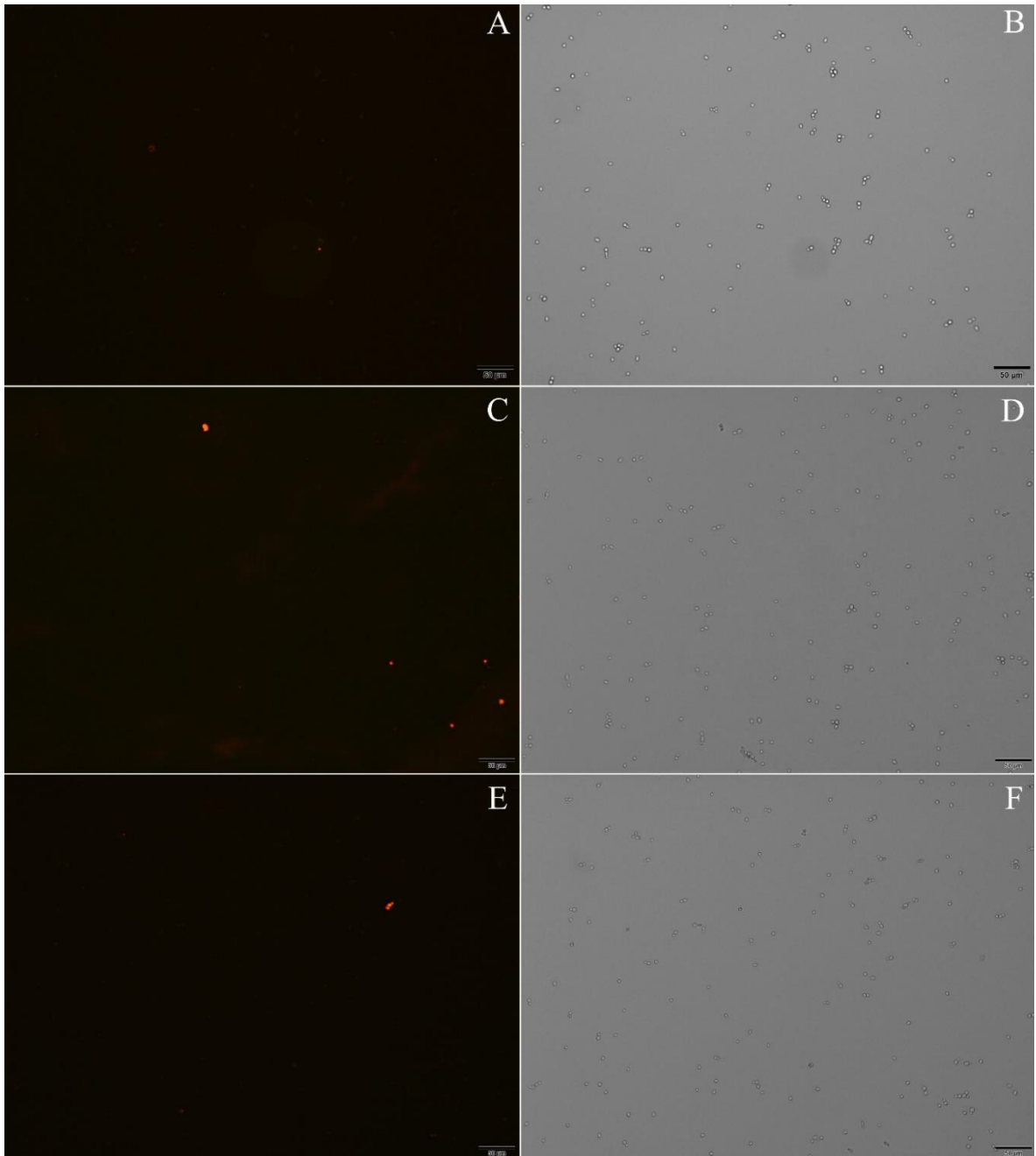




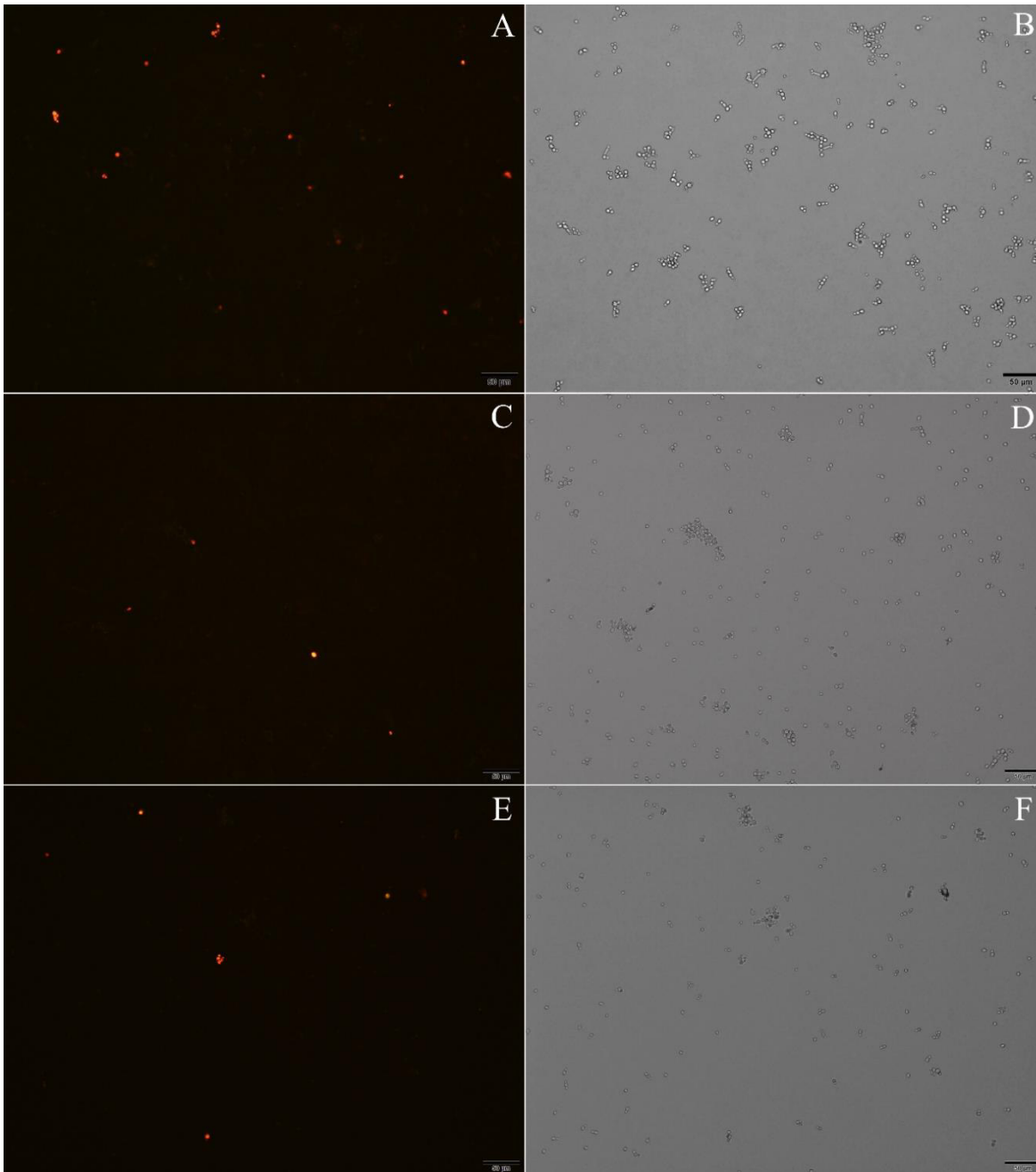
**Figura 14.** Micrografias da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* cultivada em meio semidefinido contendo xilose e glicose como fontes de carbono (fermentação 1) após 0 h (A), 24 h (C) e 48 h (D) de cultivo. Visualização do campo claro das lâminas observadas após 0 h (B), 24 h (D) e 48 h (F) de cultivo. A levedura foi visualizada no microscópio de fluorescência aplicando um aumento de 200X.



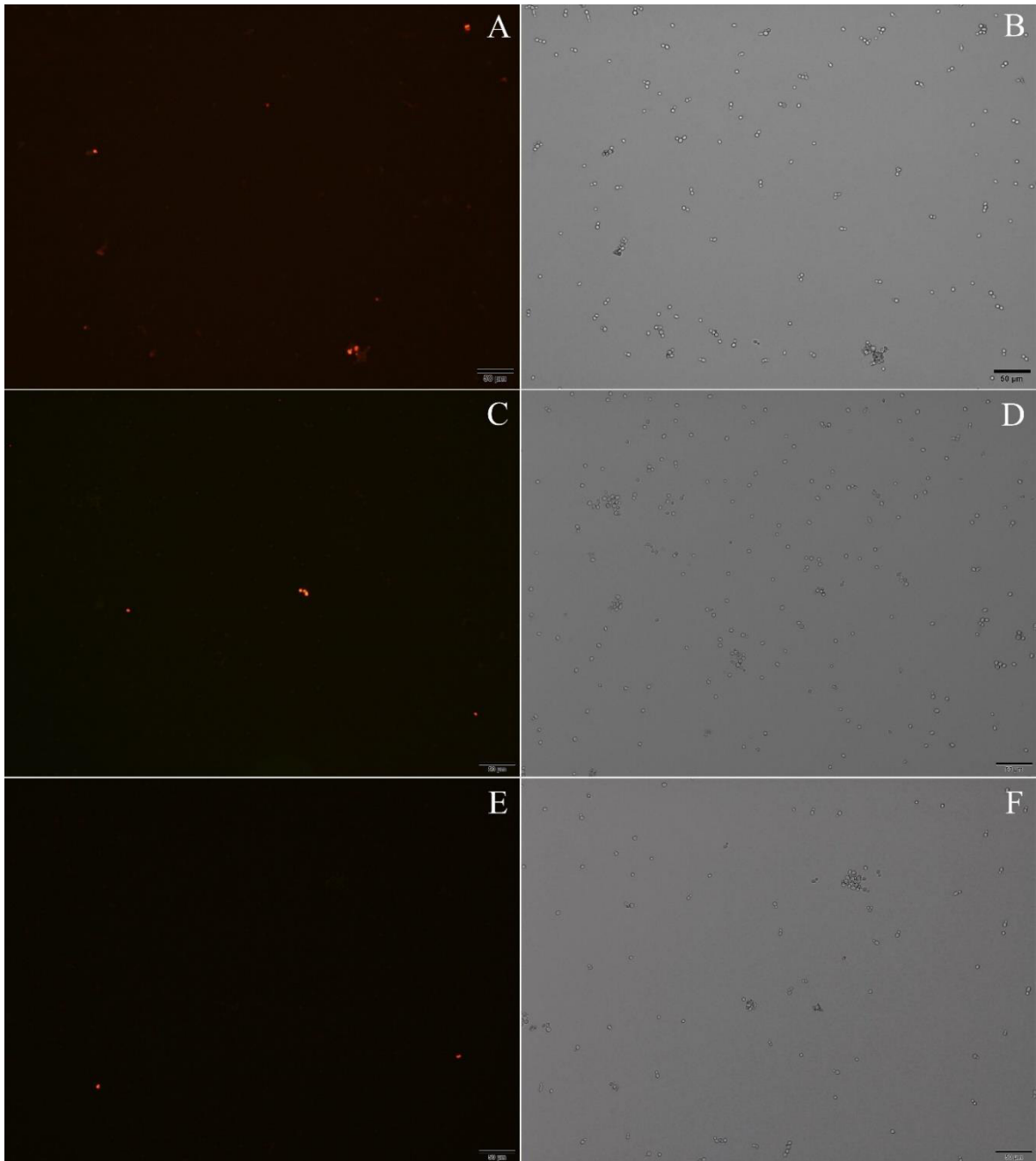
**Figura 15.** Micrografias da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* cultivada em HHBP (fermentação 2) após 0 h (A), 24 h (C) e 48 h (D) de cultivo. Visualização do campo claro das lâminas observadas após 0 h (B), 24 h (D) e 48 h (F) de cultivo. A levedura foi visualizada no microscópio de fluorescência aplicando um aumento de 200X.



**Figura 16.** Micrografias da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* adaptada ao hidrolisado concentrado e destoxificado cultivada em HHBP (fermentação 3) após 0 h (A), 24 h (C) e 48 h (D) de cultivo. Visualização do campo claro das lâminas observadas após 0 h (B), 24 h (D) e 48 h (F) de cultivo. A levedura foi visualizada no microscópio de fluorescência aplicando um aumento de 200X.



**Figura 17.** Micrografias da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* adaptada ao hidrolisado original cultivada em HHBP (fermentação 4) após 0 h (A), 24 h (C) e 48 h (E) de cultivo. Visualização do campo claro das lâminas observadas após 0 h (B), 24 h (D) e 48 h (F) de cultivo. A levedura foi visualizada no microscópio de fluorescência aplicando um aumento de 200X.



**Figura 18.** Micrografias da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* adaptada ao hidrolisado concentrado e não destoxificado cultivada em HHBP (fermentação 5) após 0 h (A), 24 h (C) e 48 h (D) de cultivo. Visualização do campo claro das lâminas observadas após 0 h (B), 24 h (D) e 48 h (F) de cultivo. A levedura foi visualizada no microscópio de fluorescência aplicando um aumento de 200X.

O efeito negativo de baixos valores de pH sob a viabilidade celular de leveduras também foi relatado por outros autores. Fermentações em meio semidefinido não tamponado contendo glicose e/ou xilose empregando *C. tropicalis* apresentaram uma rápida queda do pH nas primeiras horas de cultivo e uma alta proporção de células inviáveis ao longo da fermentação (Queiroz, 2019). Para *S. boulardii* cultivada em meio Sabouraud pH 1,1, foi relatada uma rápida redução da viabilidade celular após apenas

cinco minutos de cultivo. Após 2 h, algumas células de *S. boulardii* apresentaram danos morfológicos e deformação na parede celular. A redução da viabilidade também foi observada para cultivos em pH 2,0 e 3,0, porém em menores proporções. Em pH 4,0 e 6,8, a viabilidade celular da levedura não foi afetada (Graff et al., 2008). Yamakawa et al. (2019) também relataram a redução na viabilidade celular de *S. cerevisiae* em 14,1 % após uma hora de tratamento ácido a 30 °C empregando pH 1,80. Segundo os autores, esta condição resultou na maior proporção de células inviáveis quando comparada aos outros valores de pH analisados (2,05, 2,65 e 3,25). Nota-se que a maior quantidade de células inviáveis foi obtida empregando o mesmo valor de pH que a fermentação em meio semidefinido atingiu após 72 h neste trabalho. Embora a redução do pH tenha resultado em uma maior proporção de células com a membrana não íntegra na fermentação 1, esta redução ao longo do tempo de cultivo parece beneficiar a produção de xilitol por *C. tropicalis* (Figura 7).

Em relação às fermentações no HHBP, os mecanismos de tolerância aos inibidores de origem lignocelulósica podem ter sido os responsáveis pelos resultados de fluorescência observados. Embora nos tempos avaliados a levedura estivesse em plena atividade metabólica, sem restrição de fontes de carbono e nutrientes, os mecanismos de tolerância empregados por *C. tropicalis* podem ter contribuído para o fornecimento de maior resistência e maior integridade da membrana plasmática após 24 e 48 h de fermentação.

Comportamento similar foi relatado durante a avaliação do efeito de 2,0 gL<sup>-1</sup> de fenol sob *C. tropicalis* cultivada em meio semidefinido contendo glicose como fonte de carbono (Wang et al., 2020b). Os autores observaram a inibição de *C. tropicalis* e a retomada do crescimento após 20 h de exposição ao fenol, indicando que mecanismos de tolerância foram ativados para proteger a célula e reter a viabilidade celular durante o período de estresse. Os autores mencionam, ainda, que *C. tropicalis* apresentou uma redução da porcentagem de células com acúmulo de espécies reativas de oxigênio de 30,3 % nas primeiras 3h de cultivo para 10,2 % em 9 h, sendo esta redução associada à superexpressão da enzima superóxido dismutase em 3 e 6 h e das enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase em 6 e 9 h. Os autores também relataram a superexpressão de genes relacionados ao remodelamento da parede celular e ao enriquecimento de quitina, bem como a inibição de genes envolvidos na degradação de ácidos graxos e o consequente acúmulo destes na célula. O acúmulo e modulação da produção de ácidos graxos também é relatado por outros autores em resposta à presença de inibidores no meio. Yang et al.

(2012) observaram para *S. cerevisiae* cultivada em meio semidefinido contendo glicose e na presença de ácido acético ( $5,3 \text{ gL}^{-1}$ ), furfural ( $1,3 \text{ gL}^{-1}$ ) e fenol ( $0,5 \text{ gL}^{-1}$ ) o aumento da produção de ácidos graxos de cadeia longa e do grau de insaturação destes. Além disso, também foi observada a diminuição da produção de ácidos graxos de cadeia curta e de seus respectivos graus de insaturação. Tal modulação do metabolismo lipídico levou ao aumento da integridade da membrana plasmática, bem como à diminuição de sua permeabilidade e fluidez, conferindo à *S. cerevisiae* um fenótipo mais robusto.

O aumento do conteúdo de ergosterol em resposta à presença de agentes lipofílicos também é descrito como um dos mecanismos empregados por leveduras para a manutenção da integridade, permeabilidade e fluidez da membrana plasmática. Balbino et al. (2021) observaram o aumento do conteúdo de ergosterol para *K. marxianus* cultivada em meio semidefinido contendo glicose como fonte de carbono e na presença de 2-feniletanol, após 2 h de cultivo. Guo et al. (2018) relataram o contínuo aumento no conteúdo de ergosterol até a fase estacionária de crescimento de *S. cerevisiae*, também cultivada em meio semidefinido contendo glicose, e na presença dos ácidos cinâmico, levulínico, acético e fórmico. Segundo Godinho et al. (2018), transportadores ABC localizados na membrana plasmática de *S. cerevisiae* estão envolvidos no tráfico de lipídeos, contribuindo para a homeostase da membrana por meio de processos como absorção e incorporação de ergosterol e translocação de fosfolipídeos entre as monocamadas da membrana plasmática e manutenção da assimetria da membrana plasmática.

Mecanismos de resistência ativados nas primeiras horas de cultivo podem estar associados à geração de um fenótipo mais robusto e à consequente menor proporção de células coradas nas fermentações em HHBP após 24 e 48 h. Deste modo, é necessária a avaliação nas primeiras horas de fermentações para inferir o efeito do HHBP sob a integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis*, porém tempos intermediários a 0 e 24 h não foram avaliados no presente trabalho. Para comparação do HHBP com o cultivo em meio semidefinido sem a presença de inibidores de origem lignocelulósica é necessário realizar o tamponamento do meio, de modo que a redução do pH ao longo da fermentação não seja um fator que afete a integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis*.

## 6 CONCLUSÕES

A adaptação de *C. tropicalis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana (HHBP) concentrado e destoxificado se mostrou eficaz para melhorar a produção biotecnológica de xilitol, uma vez que aumentou o rendimento de xilitol e a eficiência de conversão de xilose em xilitol em 13,3 % e a produtividade volumétrica de xilitol em 7,1 % após 48 h de cultivo. Tal comportamento não foi observado ao adaptar a levedura aos hidrolisados original e concentrado, sugerindo a importância de utilizar o hidrolisado destoxificado neste processo.

Essa estratégia também aumentou o consumo de arabinose pela levedura, indicando um possível alívio da repressão catabólica do consumo de arabinose pela xilose.

A utilização do HHBP concentrado e destoxificado na etapa de preparação do inóculo pode ainda reduzir os custos da produção biotecnológica de xilitol em larga escala.

Em relação ao consumo de inibidores, a adaptação de *C. tropicalis* ao HHBP concentrado e destoxificado contribuiu para o aumento da velocidade de consumo de 5-HMF pela levedura, não sendo observado, contudo, melhorias no consumo de ácido acético e dos compostos fenólicos avaliados.

Nas condições e tempos avaliados, os inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico não afetaram a integridade da membrana plasmática, sendo a drástica redução do pH ao longo da fermentação em meio semidefinido mais prejudicial para a estrutura da membrana celular da levedura.

A realização do processo adaptativo acarretou em uma menor remoção de fenólicos totais ao longo das fermentações, o que permitiu inferir a existência de possíveis alterações fisiológicas na levedura, como modificações na parede celular e expressão de transportadores ativos, as quais ainda precisam ser avaliadas em pesquisas futuras.



## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam para a necessidade de novas investigações ou abordagens, visando o maior entendimento do comportamento fisiológico da levedura *C. tropicalis* frente o cultivo no hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana e a melhoria do processo biotecnológico de produção de xilitol, como:

- Avaliação do efeito de ciclos sucessivos de adaptação como para elevar ainda mais a produção de xilitol por *C. tropicalis*;
- Realização do processo adaptativo da levedura e subsequente fermentação em hidrolisado concentrado e não destoxificado para eliminação da etapa de destoxificação, reduzindo assim custo, tempo e operações unitárias do bioprocessos;
- Estudo do plaqueamento da linhagem adaptada de *C. tropicalis* em meio sólido contendo HHBP concentrado e destoxificado buscando a manutenção de seu fenótipo robusto e a remoção da necessidade de adaptação das próximas fermentações;
- Estudo da repressão catabólica do consumo de arabinose pela presença de xilose pela análise da expressão de transportadores e enzimas associadas à esta via metabólica;
- Avaliação da integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* nas primeiras horas de fermentação para análise do efeito do HHBP sobre esta subestrutura celular;
- Avaliação do efeito do pH sobre o crescimento e produção de xilitol por *C. tropicalis*, além do seu efeito na integridade da membrana plasmática e na manutenção da viabilidade celular da levedura;
- Análise de possíveis alterações na parede celular de *C. tropicalis* proporcionadas pelo cultivo em hidrolisado e pelo processo de adaptação;
- Avaliação da expressão de transportadores ativos de xenobióticos durante cultivo em hidrolisado para avaliação dos mecanismos de resistência relacionados às fermentações em hidrolisados hemicelulósicos.

## 8 PRODUÇÕES CIENTÍFICAS NO PERÍODO

- **Artigos**

Bianchini, I.A., Sene, L., Cunha, M.A.A., Felipe, M.G.A. Short-term adaptation strategy improved xylitol production by *Candida guilliermondii* on sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. *Bioenergy Research*, p. 1-13, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10324-x>.

Bordini, F.W., Bianchini, I.A., Boaes, T.S., Balbino, T.R., Barreto, M.A.M. Ensino remoto como alternativa educacional para estudantes de graduação dos cursos de engenharias durante a pandemia de Covid-19. *Revista de Ensino de Engenharia*, 2022.

Queiroz, S.S., Jofre, F.M., Bianchini, I.A., Bordini, F.W., Boaes, T.S., Felipe, M.G.A. Biotechnological potential of *Candida tropicalis*: a review. (Em preparação para submissão à revista *Biotechnology Advances*)

- **Capítulos de livros**

Jofre, F.M., Bordini, F.W., Bianchini, I.A., Queiroz, S.S.; Boaes, T.S., Hernández-Pérez, A.F., Felipe, M.G.A. Xylitol and Sorbitol: Challenges and opportunities in biorefineries integration. In: Chandel, A.K., Segato, F. *Production of Top 12 Biochemicals Selected by USDOE from Renewable Resources*. 1. ed. Elsevier, 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823531-7.00013-5>.

Queiroz, S.S., Jofre, F.M., Bianchini, I.A., Bordini, F.W., Boaes, T.S., Chandel, A.K., Felipe, M.G.A. Fermentative Production of Xylitol from Various Lignocellulosic Hydrolysates. In: Felipe, M.G.A., Chandel, A.K. *Current Advances in Biotechnological Production of Xylitol*. 1 ed. Springer Nature, 2022. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-04942-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-031-04942-2_3).

- **Apresentação de trabalhos**

Bianchini, I.A., Jofre, F.M., Queiroz, S.S., Felipe, M.G.A. Effect of sugarcane bagasse and straw hemicellulosic hydrolysate on the xylitol production by *Candida tropicalis*. In: V Simpósio Internacional de Microbiologia e Biotecnologia. Viçosa, 2021. (Oral)

Bianchini, I.A., Jofre, F.M., Queiroz, S.S., Felipe, M.G.A. Effect of sugarcane bagasse and straw hemicellulosic hydrolysate on the xylitol production by *Candida tropicalis*. In: V Simpósio Internacional de Microbiologia e Biotecnologia. Viçosa, 2021. (Pôster)

Bianchini, I.A., Queiroz, S.S., Santos, H.A., Franca, T.S., Felipe, M.G.A., 2021. Bioinformatic Analysis of Transporter Proteins and Enzymes Related to *Candida tropicalis*' slow L-arabinose assimilation, in: BBEST Proceedings. São Paulo, p. 158. (Pôster)

Queiroz, S.S., Jofre, F.M., Bianchini, I.A., Felipe, M.G.A. Identification and expression analyses of genes involved in xylose transport in *Candida tropicalis*. In: V Simpósio Internacional de Microbiologia e Biotecnologia. Viçosa, 2021. (Pôster)

## REFERÊNCIAS

- Adeboye, P.T., Bettiga, M., Aldaeus, F., Larsson, P.T., Olsson, L., 2015. Catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and *p*-coumaric acid by *Saccharomyces cerevisiae* yields less toxic products. *Microb Cell Fact* 14, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0338-x>
- Adeboye, P.T., Bettiga, M., Olsson, L., 2014. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. *AMB Express* 4, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0046-7>
- Aguilar-Uscanga, B., François, J.M., 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol* 37, 268–274. <https://doi.org/10.1046/J.1472-765X.2003.01394.X>
- Albuquerque, T.L., Gomes, S.D.L., Marques, J.E., Silva, I.J., Rocha, M.V.P., 2015. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. *Catal Today* 255, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.10.054>
- Almeida, J.R.M., Bertilsson, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Gorsich, S., Lidén, G., 2009. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 82, 625–638. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1875-1>
- Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>
- Arcaño, Y.D., García, O.D.V., Mandelli, D., Carvalho, W.A., Pontes, L.A.M., 2020. Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route. *Catal Today* 344, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.07.060>
- Arruda, P.V., 2011. Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Tese - Esc Eng Lorena da Univ São Paulo 163.
- Arruda, P.V., Rodrigues, R.C.L.B., Silva, D.D.V., Felipe, M.G.A., 2011. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. *Biodegradation* 22, 815–822. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9397-1>
- Arruda, P.V., Santos, J.C., Rodrigues, R.C.L.B., Silva, D.D.V., Yamakawa, C.K., Rocha, G.J.M., Júnior, J.N., Pradella, J.G.C., Rossell, C.E.V., Felipe, M.G.A., 2017. Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *J Ind Eng Chem*. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.11.046>
- Ask, M., Bettiga, M., Mapelli, V., Olsson, L., 2013. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-22>
- Aulitto, M., Fusco, S., Nickel, D.B., Bartolucci, S., Contursi, P., Franzén, C.J., 2019. Seed culture pre-adaptation of *Bacillus coagulans* MA-13 improves lactic acid production in simultaneous saccharification and fermentation. *Biotechnol Biofuels* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1382-2>

- Ávila, P.F., Forte, M.B.S., Goldbeck, R., 2018. Evaluation of the chemical composition of a mixture of sugarcane bagasse and straw after different pretreatments and their effects on commercial enzyme combinations for the production of fermentable sugars. *Biomass and Bioenergy* 116, 180–188. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2018.06.015>
- Balbino, T.R., da Silveira, F.A., Ventorim, R.Z., do Nascimento, A.G., de Oliveira, L.L., da Silveira, W.B., 2021. Adaptive responses of *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 to 2-phenylethanol stress: Alterations in membrane fatty-acid composition, ergosterol content, exopolysaccharide production and reduction in reactive oxygen species. *Fungal Genet Biol* 151, 103561. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103561>
- Barbosa, M.F.S., Medeiros, M.B., Mancilha, I.M., Schneider, H., Lee, H., 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J Ind Microbiol* 3, 241–251. <https://doi.org/10.1007/BF01569582>
- Benahmed, A.G., Gasmi, A., Arshad, M., Shanaida, M., Lysiuk, R., Peana, M., Pshyk-Titko, I., Adamiv, S., Shanaida, Y., Bjørklund, G., 2020. Health benefits of xylitol. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 7225–7237. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10708-7>
- Benjamin, Y., Görgens, J.F., Joshi, S. V., 2014. Comparison of chemical composition and calculated ethanol yields of sugarcane varieties harvested for two growing seasons. *Ind Crops Prod* 58, 133–141. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2014.04.010>
- Bettiga, M., Bengtsson, O., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M.F., 2009. Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway. *Microb Cell Fact* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-40>
- Bezerra, T.L., Ragauskas, A.J., 2016. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. *Biofuels, Bioprod Biorefining*. <https://doi.org/10.1002/bbb.1662>
- Bianchini, I.A., Queiroz, S.S., Santos, H.A., Franca, T.S., Felipe, M.G.A., 2021a. Bioinformatic Analysis of Transporter Proteins and Enzymes Related do *Candida tropicalis*' slow L-arabinose assimilation, in: BBEST Proceedings. São Paulo, p. 158.
- Bianchini, I.A., Sene, L., Cunha, M.A.A., Felipe, M.G.A., 2021b. Short-term Adaptation Strategy Improved Xylitol Production by *Candida guilliermondii* on Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate. *Bioenergy Res* 1, 1–13. <https://doi.org/10.1007/S12155-021-10324-X/FIGURES/4>
- Bozell, J.J., 2008. Feedstocks for the future - Biorefinery production of chemicals from renewable carbon. *Clean - Soil, Air, Water* 36, 641–647. <https://doi.org/10.1002/clen.200800100>
- Bracher, J.M., Verhoeven, M.D., Wisselink, H.W., Crimi, B., Nijland, J.G., Driessen, A.J.M., Klaassen, P., van Maris, A.J.A., Daran, J.M.G., Pronk, J.T., 2018. The *Penicillium chrysogenum* transporter Pc AraT enables high-affinity, glucose-insensitive l -arabinose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13068-018-1047-6>
- Candan, Z., Tozluoglu, A., Gonultas, O., Yildirim, M., Fidan, H., Alma, M.H., Salan, T., 2022. Nanocellulose: Sustainable biomaterial for developing novel adhesives and composites. *Ind Appl Nanocellulose Its Nanocomposites* 49–137.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89909-3.00015-8>

Carvalho, J.L.N., Nogueirol, R.C., Menandro, L.M.S., Bordonal, R.O., Borges, C.D., Cantarella, H., Franco, H.C.J., 2017. Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review. *GCB Bioenergy* 9, 1181–1195. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12410>

Cheng, K.K., Zhang, J.A., Ling, H.Z., Ping, W.X., Huang, W., Ge, J.P., Xu, J.M., 2009. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. *Biochem Eng J* 43, 203–207. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2008.09.012>

CONAB, 2021. Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana de açúcar - V.8 - SAFRA 2021/22 - N.3 - Terceiro levantamento - Novembro 2021.

Cooper, B.H., Land, G.A., 1979. Assimilation of protocatechuic acid and *p*-hydroxybenzoic acid as an aid to laboratory identification of *Candida parapsilosis* and other medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 10, 343–345. <https://doi.org/10.1128/JCM.10.3.343-345.1979>

Cortez, D.V., Roberto, I.C., 2010. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. *Bioresour Technol*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.072>

Costa, W.L.S., Bocchi, M.L.M., 2012. Aplicação do bagaço de cana-de-açúcar utilizadas na atualidade. *Ciência e Tecnol*.

Crowley, L.C., Scott, A.P., Marfell, B.J., Boughaba, J.A., Chojnowski, G., Waterhouse, N.J., 2016. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016, pdb.prot087163. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT087163>

Dasgupta, D., Bandhu, S., Adhikari, D.K., Ghosh, D., 2017. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. *Microbiol Res* 197, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.012>

Ding, M.Z., Wang, X., Yang, Y., Yuan, Y.J., 2012. Comparative metabolic profiling of parental and inhibitors-tolerant yeasts during lignocellulosic ethanol fermentation. *Metabolomics* 8, 232–243. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0303-6>

Duarte, L.C., Carvalheiro, F., Neves, I., Girio, F.M., 2005. Effects of Aliphatic Acids, Furfural, and Phenolic Compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Appl Biochem Biotechnol* 121–124, 413–425.

Duskova, M., Borovikova, D., Herynkova, P., Rapoport, A., Sychrova, H., 2015. The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions. *FEMS Microbiol Lett* 362. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNU041>

El Gamal, M., Mousa, H.A., El-Naas, M.H., Zacharia, R., Judd, S., 2018. Bio-regeneration of activated carbon: A comprehensive review. *Sep Purif Technol* 197, 345–359. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.01.015>

FAO, 2020. Crops and livestock products [WWW Document]. URL <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (Acessado em 14.01.22)

FAO, 2018. Part 1 – Agricultural trade: Key Dynamics and Trends, in: FAO, *The State of Agricultural Commodity Markets: Agricultural Trade, Climate Change and Food Security*.

Roma.

Felipe, M.G.A., Vieira, D.C., Vitolo, M., Silva, S.S., Roberto, I.C., Manchilha, I.M., 1995. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *J Basic Microbiol* 35, 171–177. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620350309>

Felipe, M.G.A., Vitolo, M., Mancilha, I.M., Silva, S.S., 1997. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18, 251–254. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900374>

Ferraz, A., Baeza, J., Rodriguez, J., Freer, J., 2000. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. *Bioresour Technol* 74, 201–212.

Fonseca, C., Romão, R., Sousa, H.R., Hahn-Hägerdal, B., Spencer-Martins, I., 2007. L - Arabinose transport and catabolism in yeast. *FEBS J* 274, 3589–3600. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05892.x>

Giannattasio, S., Guaragnella, N., Ždravlević, M., Marra, E., 2013. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Front Microbiol* 4, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00033>

Global Market Insights, 2019. Xylitol Market Size By Application (Chewing Gum, Confectionary, Food, Personal Care, Pharmaceuticals, Nutraceuticals), Downstream Application Potential (Xylaric Acid, Ethylene Glycol, Propylene Glycol), Industry Analysis Report, Regional Outlook, Industry [WWW Document]. URL <https://www.gminsights.com/industry-analysis/xylitol-market> (acessado 9.30.20).

Godinho, C.P., Prata, C.S., Pinto, S.N., Cardoso, C., Bandarra, N.M., Fernandes, F., Sá-Correia, I., 2018. Pdr18 is involved in yeast response to acetic acid stress counteracting the decrease of plasma membrane ergosterol content and order. *Sci Reports* 2018 8, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26128-7>

Graff, S., Chaumeil, J.C., Boy, P., Lai-Kuen, R., Charrueau, C., 2008. Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast. *J Gen Appl Microbiol* 54, 221–227. <https://doi.org/10.2323/JGAM.54.221>

Granström, T.B., Izumori, K., Leisola, M., 2007. A rare sugar xylitol. Part I: The biochemistry and biosynthesis of xylitol. *Appl Microbiol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0761-3>

Gu, H., Zhu, Y., Peng, Y., Liang, X., Liu, X., Shao, L., Xu, Y., Xu, Z., Liu, R., Li, J., 2019. Physiological mechanism of improved tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to lignin-derived phenolic acids in lignocellulosic ethanol fermentation by short-term adaptation. *Biotechnol Biofuels* 12, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1610-9>

Guo, Z., Khoomrung, S., Nielsen, J., Olsson, L., 2018. Changes in lipid metabolism convey acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 11, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1295-5>

Guo, Z., Olsson, L., 2014. Physiological response of *Saccharomyces cerevisiae* to weak acids present in lignocellulosic hydrolysate. *FEMS Yeast Res* 14, 1234–1248. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12221>

Hernández-Pérez, A.F., 2019. Produção biotecnológica de xilitol a partir da mistura de

bagaço e palha de cana-de-açúcar com aproveitamento do melaço: Otimização das condições de cultivo e engenharia da via metabólica. Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo.

Hernández-Pérez, A.F., 2015. Aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol: Estudo da atuação de co-substratos e permeabilizante de membrana celular. Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo.

Hernández-Pérez, A.F., Arruda, P.V., Felipe, M.G.A., 2016a. Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Brazilian J Microbiol* 47, 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.019>

Hernández-Pérez, A.F., Arruda, P.V., Sene, L., Silva, S.S., Chandel, A.K., Felipe, M.G.A., 2019. Xylitol bioproduction: state-of-the-art, industrial paradigm shift, and opportunities for integrated biorefineries. *Crit Rev Biotechnol* 39, 924–943. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1640658>

Hernández-Pérez, A.F., Chaves-Villamil, A.C., Arruda, P.V., Santos, J.C., Felipe, M.G.A., 2020. Sugarcane Syrup Improves Xylitol Bioproduction from Sugarcane Bagasse and Straw Hemicellulosic Hydrolysate. *Waste and Biomass Valorization* 11, 4215–4224. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00742-6>

Hernández-Pérez, A.F., Costa, I.A.L., Silva, D.D.V., Dussán, K.J., Villela, T.R., Canettieri, E. V., Carvalho, J.A., Soares Neto, T.G., Felipe, M.G.A., 2016b. Biochemical conversion of sugarcane straw hemicellulosic hydrolyzate supplemented with co-substrates for xylitol production. *Bioresour Technol* 200, 1085–1088. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.036>

Hou-Rui, Z., 2012. Key Drivers Influencing the Large Scale Production of Xylitol, in: Da Silva, S.S., Chandel, A.K. (Orgs.), *D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization*. Springer, Berlin, p. 267–289. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0>

Jofre, F.M., 2019. Aproveitamento da biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037 como agente destoxicante do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol. Escola de Engenharia de São Paulo - Universidade de São Paulo.

Jofre, F.M., Hernández-Pérez, A.F., Santos, J.C., Felipe, M.G.A., 2021. Use of dry yeast biomass as a new approach for detoxification of hemicellulosic hydrolysates aiming to xylitol production. *Ind Crops Prod* 170, 113812. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.113812>

Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>

Juturu, V., Wu, J.C., 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renew Sustain Energy Rev*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>

Kelly, C., Jones, O., Barnhart, C., Lajoie, C., 2008. Effect of furfural, vanillin and syringaldehyde on *Candida guilliermondii* growth and xylitol biosynthesis. *Appl Biochem Biotechnol* 148, 97–108. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8103-1>

- Kim, S., 2019. Xylitol production from byproducts generated during sequential acid-/alkali-pretreatment of empty palm fruit bunch fiber by an adapted *Candida tropicalis*. *Front Energy Res* 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00072>
- Kim, T.Y., Lee, J.W., Cho, S.Y., 2015. Application of residual brewery yeast for adsorption removal of Reactive Orange 16 from aqueous solution. *Adv Powder Technol* 26, 267–274. <https://doi.org/10.1016/J.APT.2014.10.006>
- Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B.K., 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 10–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1642-2>
- Knoshaug, E.P., Vidgren, V., Magalhães, F., Jarvis, E.E., Franden, M.A., Zhang, M., Singh, A., 2015. Novel transporters from *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia guilliermondii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* enable growth on L-arabinose and D-xylose. *Yeast* 32, 615–628. <https://doi.org/10.1002/yea>
- Korponyai, C., Szél, E., Behány, Z., Varga, E., Mohos, G., Dura, Á., Dikstein, S., Kemény, L., Erős, G., 2017. Effects of locally applied glycerol and xylitol on the hydration, barrier function and morphological parameters of the skin. *Acta Derm Venereol*. <https://doi.org/10.2340/00015555-2493>
- Laadan, B., Almeida, J.R.M., Rådström, P., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M., 2008. Identification of an NADH-dependent 5-hydroxymethylfurfural-reducing alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 25, 191–198. <https://doi.org/10.1002/YEA.1578>
- Lago, A.C., Bonomi, A., Cavalett, O., Cunha, M.P., Lima, M.A.P., 2012. Sugarcane as a carbon source: The Brazilian case. *Biomass and Bioenergy* 46, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.007>
- Landaeta, R., Aroca, G., Acevedo, F., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I., 2013. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. *Appl Energy* 102, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.06.048>
- Li, H., Ma, M.L., Luo, S., Zhang, R.M., Han, P., Hu, W., 2012a. Metabolic responses to ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* using a gas chromatography tandem mass spectrometry-based metabolomics approach. *Int J Biochem Cell Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.03.017>
- Li, L.L., Ye, Y.R., Pan, L., Zhu, Y., Zheng, S.P., Lin, Y., 2009. The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 778–783. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2009.07.113>
- Li, M., Meng, X., Diao, E., Du, F., 2012b. Xylitol production by *Candida tropicalis* from corn cob hemicellulose hydrolysate in a two-stage fed-batch fermentation process. *J Chem Technol Biotechnol* 87, 387–392. <https://doi.org/10.1002/JCTB.2732>
- Lima, L.H.A., Felipe, M.G.A., Vitolo, M., Torres, F.A.G., 2004. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 734–738. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1612-8>
- Lindberg, L., Santos, A.X.S., Riezman, H., Olsson, L., Bettiga, M., 2013. Lipidomic



Profiling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* Reveals Critical Changes in Lipid Composition in Response to Acetic Acid Stress. PLoS One 8, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073936>

Liu, Z.L., 2011. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. Appl Microbiol Biotechnol 90, 809–825. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3167-9>

Liu, Z.L., Ma, M., Song, M., 2009. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. Mol Genet Genomics 282, 233–244. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0461-7>

Liu, Z.L., Slininger, P.J., Dien, B.S., Berhow, M.A., Kurtzman, C.P., Gorsich, S.W., 2004. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. J Ind Microbiol Biotechnol 31, 345–352. <https://doi.org/10.1007/S10295-004-0148-3>

López-Linares, J.C., Romero, I., Cara, C., Castro, E., Mussatto, S.I., 2018. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. Bioresour Technol 247, 736–743. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.139>

Martínez, E.A., Canettieri, E. V., Bispo, J.A.C., Giulietti, M., Silva, J.B.A., Converti, A., 2015. Strategies for xylitol purification and Crystallization: A review. Sep Sci Technol 50, 2087–2098. <https://doi.org/10.1080/01496395.2015.1009115>

Marton, J.M., Felipe, M.G.A., Silva, J.B.A., Pessoa, A., 2006. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. Brazilian J Chem Eng 23, 9–21. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322006000100002>

Matos, G.S., 2004. Adaptação e reciclagem de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar: Efeito sobre as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase. Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo.

McCormick, K., Kautto, N., 2013. The Bioeconomy in Europe: An Overview. Sustain 5, 2589–2608. <https://doi.org/10.3390/su5062589>

Menna, M.E., 1959. Some physiological characters of yeasts from soils and allied habitats. J Gen Microbiol 20, 13–23. <https://doi.org/10.1099/00221287-20-1-13/CITE/REFWORKS>

Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. Prog Energy Combust Sci 38, 522–550. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>

Middelhoven, W.J., 1993. Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeasts and yeastlike fungi. Antonie van Leeuwenhoek 1993 632 63, 125–144. <https://doi.org/10.1007/BF00872388>

Mills, T.Y., Sandoval, N.R., Gill, R.T., 2009. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. Biotechnol Biofuels 2, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-26>

Misra, S., Raghuwanshi, S., Saxena, R.K., 2013. Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. Carbohydr Polym 92, 1596–1601. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.033>

- Mood, S.H., Golfeshan, A.H., Tabatabaei, M., Jouzani, G.S., Najafi, G.H., Gholami, M., Ardjmand, M., 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew Sustain Energy Rev* 27, 77–93. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>
- Moraes, E.J.C., Silva, D.D.V., Dussán, K.J., Tesche, L.Z., Silva, J.B.A., Rai, M., Felipe, M.G.A., 2018. Xylitol-Sweetener Production from Barley Straw: Optimization of Acid Hydrolysis Condition with the Energy Consumption Simulation. *Waste and Biomass Valorization* 11, 1837–1849. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0501-9>
- Moutta, R.D.O., Ferreira-Leitão, V.S., Bon, E.P.D.S., 2014. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid. <https://doi.org/10.3109/10242422.2013.873795> 32, 93–100. <https://doi.org/10.3109/10242422.2013.873795>
- Mudhoo, A., Kumar, S., 2013. Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass. *Int J Environ Sci Technol* 10, 1383–1398. <https://doi.org/10.1007/s13762-012-0167-y>
- Mussatto, S.I., 2012. Application of Xylitol in Food Formulations and Benefits for Health, in: Da Silva, S.S., Chandel, A.K. (Eds.), *D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization*. Springer, Berlin, p. 309–323. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0>
- Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. *Bioresour Technol* 93, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.005>
- Narayanan, V., Sánchez i Nogué, V., van Niel, E.W.J., Gorwa-Grauslund, M.F., 2016. Adaptation to low pH and lignocellulosic inhibitors resulting in ethanolic fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express* 6, 59–71. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0234-8>
- Nielsen, F., Tomás-Pejó, E., Olsson, L., Wallberg, O., 2015. Short-term adaptation during propagation improves the performance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and co-fermentation. *Biotechnol Biofuels* 8, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0399-4>
- Nogueira, M., Istel, F., Jenull, S., Walker, L., Gow, N., Lion, T., 2017. Quantitative Analysis of *Candida* Cell Wall Components by Flow Cytometry with Triple-Fluorescence Staining. *J Microbiol Mod Tech* 2, 1–9. <https://doi.org/10.15744/2575-5498.2.101>
- OECD-FAO, 2018. Chapter 5 – Sugar, in: OECD/FAO, *OECD-FAO Agricultural Outlook 2018 – 2027*. Roma.
- Oktaviani, M., Mangunwardoyo, W., Hermiati, E., 2021. Characteristics of adapted and non-adapted *Candida tropicalis* InaCC Y799 during fermentation of detoxified and undetoxified hemicellulosic hydrolysate from sugarcane trash for xylitol production. *Biomass Convers Biorefinery* 1, 1–13. <https://doi.org/10.1007/S13399-021-02087-4/FIGURES/4>
- Palma, M., Guerreiro, J.F., Sá-Correia, I., 2018. Adaptive response and tolerance to acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: A physiological genomics perspective. *Front Microbiol* 9, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00274>

- Pereira, R.S., Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2011. Inhibitory action of toxic compounds present in lignocellulosic hydrolysates on xylose to xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38, 71–78. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0830-6>
- Pereyra, C.M., Gil, S., Cristofolini, A., Bonci, M., Makita, M., Monge, M.P., Montenegro, M.A., Cavaglieri, L.R., 2018. The production of yeast cell wall using an agroindustrial waste influences the wall thickness and is implicated on the aflatoxin B1 adsorption process. *Food Res Int* 111, 306–313. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.05.026>
- Phalgune, U.D., Rajamohanan, P.R., Gaikwad, B.G., Varma, R.J., George, S., 2013. Biodegradation of phenol by the yeast *Candida tropicalis*: An investigation by NMR spectroscopy. *Appl Biochem Biotechnol* 169, 2029–2037. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0119-0>
- Ping, Y., Ling, H.Z., Song, G., Ge, J.P., 2013. Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. *Biochem Eng J* 75, 86–91. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2013.03.022>
- Pippo, W.A., Luengo, C.A., Alberteris, L.A.M., Garzone, P., Cornacchia, G., 2011. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects. *Waste and Biomass Valorization* 2, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12649-010-9048-0>
- Puligundla, P., Oh, S.E., Mok, C., 2016. Microwave-assisted pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass to sugars and ethanol: A review. *Carbon Lett* 17, 1–10. <https://doi.org/10.5714/CL.2016.17.1.001>
- Queiroz, S.S., 2019. Identificação e quantificação da expressão dos genes envolvidos no transporte de xilose na levedura *Candida guilliermondii* FTI20037. Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo.
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J.P., Carrre, H., Trably, E., 2012. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy* 37, 3150–3159. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.11.033>
- Ran, H., Zhang, J., Gao, Q., Lin, Z., Bao, J., 2014. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5- hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnol Biofuels* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-51>
- Rao, L.V., Goli, J.K., Gentela, J., Koti, S., 2016. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. *Bioresour Technol* 213, 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.092>
- Rao, R.S., Jyothi, C.P., Prakasham, R.S., Sarma, P.N., Rao, L.V., 2006. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. *Bioresour Technol* 97, 1974–1978. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.08.015>
- Rehman, A., Anjum, M.S., Rehman, A., Anjum, M.S., 2010. Multiple metal tolerance and biosorption of cadmium by *Candida tropicalis* isolated from industrial effluents: glutathione as detoxifying agent. *Environ Monit Assess* 2010 1741 174, 585–595. <https://doi.org/10.1007/S10661-010-1480-X>
- Rehman, A., Farooq, H., Shakoori, A.R., 2007. Copper tolerant yeast, *Candida tropicalis*,

isolated from industrial effluents: Its potential use in wastewater treatment. *Pak J Zool* 39, 405–412.

Rocha, G.J.M., Martín, C., Silva, V.F.N., Gómez, E.O., Gonçalves, A.R., 2012. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. *Bioresour Technol* 111, 447–452.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.005>

Rodrigues, R.C.L.B., Felipe, M.G.A., Silva, J.B.A., Vitolo, M., 2003. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. *Process Biochem.*  
[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00290-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00290-X)

Rodrigues, R.C.L.B., Felipe, M.G.A., Silva, J.B.A., Vitolo, M., Gómez, P.V., 2001. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and non volatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. *Brazilian J Chem Eng* 18, 299–311.  
<https://doi.org/10.1590/S0104-66322001000300009>

Rodrigues, R.C.L.B., Sene, L., Matos, G.S., Roberto, I.C., Pessoa, A., Felipe, M.G.A., 2006. Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. *Curr Microbiol* 53, 53–59.  
<https://doi.org/10.1007/S00284-005-0242-4/FIGURES/2>

Rottmann, T., Klebl, F., Schneider, S., Kischka, D., Rüscher, D., Sauer, N., Stadler, R., 2018. Sugar Transporter STP7 Specificity for L-Arabinose and D-Xylose Contrasts with the Typical Hexose Transporters STP8 and STP12. *Plant Physiol* 176, 2330–2350.  
<https://doi.org/10.1104/PP.17.01493>

Rubin, E.M., 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*.  
<https://doi.org/10.1038/nature07190>

Sá-Correia, I., Godinho, C.P., 2022. Exploring the biological function of efflux pumps for the development of superior industrial yeasts. *Curr Opin Biotechnol* 74, 32–41.  
<https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2021.10.014>

Sanchez, B., Bautista, J., 1988. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. *Enzyme Microb Technol.* [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(88\)90135-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90135-4)

Santos, J.C., Marton, J.M., Felipe, M.G.A., 2014. Continuous system of combined columns of ion exchange resins and activated charcoal as a new approach for the removal of toxics from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate. *Ind Eng Chem Res* 53, 16494–16501.  
<https://doi.org/10.1021/ie502712j>

Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* 61, 263–289.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>

Sene, L., Felipe, M.G.A., Vitolo, M., Silva, S.S., Mancilha, I.M., 1998. Adaptation and reutilization of *Candida guilliermondii* cells for xylitol production in bagasse hydrolysate. *J Basic Microbiol* 38, 61–69. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4028\(199803\)38:1<61::AID-JOBM61>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4028(199803)38:1<61::AID-JOBM61>3.0.CO;2-2)

Shah, S.S.M., Luthfi, A.A.I., Jahim, J.M., Harun, S., Low, K.O., 2020. An improvement in fermentability of acidhydrolysed hemicellulose from kenaf stem for xylitol production. *Int*

J Food Eng 16, 1–10. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2019-0230>

Sherrington, S.L., Sorsby, E., Mahtey, N., Kumwenda, P., Lenardon, M.D., Brown, I., Ballou, E.R., MacCallum, D.M., Hall, R.A., 2017. Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. PLOS Pathog 13, e1006403. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1006403>

Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev 59, 201–222. <https://doi.org/10.1128/membr.59.2.201-222.1995>

Silva-Fernandes, T., Santos, J.C., Hasmann, F., Rodrigues, R.C.L.B., Izario Filho, H.J., Felipe, M.G.A., 2017. Biodegradable alternative for removing toxic compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for valorization in biorefineries. Bioresour Technol 243, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.064>

Silva, D.D.V., Felipe, M.G.A., 2006. Effect of glucose:xylose ratio on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. J Chem Technol Biotechnol 81, 1294–1300. <https://doi.org/10.1002/jctb>

Silva, T.F.M., 2006. Avaliação de Polímeros de Origem Vegetal na Destoxificação de Hidrolisado de Bagaço de Cana-de-açúcar para Obtenção de Xilitol. Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo.

Skendi, A., Irakli, M., Chatzopoulou, P., 2017. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of *Lamiaceae* family by HPLC. J Appl Res Med Aromat Plants 6, 62–69. <https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2017.02.001>

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Determination of Ash in Biomass. Laboratory Analytical Procedure.

Soares, E.V., Hebbelinck, K., Soares, H.M.V.M., 2003. Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. Can J Microbiol 49, 336–343. <https://doi.org/10.1139/w03-044>

Soares, L.B., Bonan, C.I.D.G., Biazi, L.E., Dionísio, S.R., Bonatelli, M.L., Andrade, A.L.D., Renzano, E.C., Costa, A.C., Ienczak, J.L., 2020. Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-saccharomyces species. Biomass and Bioenergy 137, 105549. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105549>

Strassberger, Z., Tanase, S., Rothenberg, G., 2014. The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. RSC Adv 4, 25310–25318. <https://doi.org/10.1039/c4ra04747h>

Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2011. Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects, 1<sup>o</sup> ed, Biofuels. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00012-7>

Taherzadeh, M.J., Niklasson, C., Lidén, G., 1997. Acetic acid-friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*? Chem Eng Sci. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(97\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(97)00080-8)

Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Oliva, J.M., Olsson, L., 2010. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. J Ind Microbiol Biotechnol 37, 1211–1220.

<https://doi.org/10.1007/s10295-010-0768-8>

Tomás-Pejó, E., Olsson, L., 2015. Influence of the propagation strategy for obtaining robust *Saccharomyces cerevisiae* cells that efficiently co-ferment xylose and glucose in lignocellulosic hydrolysates. *Microb Biotechnol* 8, 999–1005.

<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12280>

Umino, Y., Ipponjima, S., Denda, M., 2019. Modulation of lipid fluidity likely contributes to the fructose/xylitol-induced acceleration of epidermal permeability barrier recovery.

*Arch Dermatol Res.* <https://doi.org/10.1007/s00403-019-01905-0>

van Dijk, M., Erdei, B., Galbe, M., Nygård, Y., Olsson, L., 2019. Strain-dependent variance in short-term adaptation effects of two xylose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* 292, 121922.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121922>

van Dijk, M., Mierke, F., Nygård, Y., Olsson, L., 2020. Nutrient-supplemented propagation of *Saccharomyces cerevisiae* improves its lignocellulose fermentation ability.

*AMB Express* 10. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01070-y>

Varanda, L.L., Cherubin, M.R., Cerri, C.E.P., 2019. Decomposition dynamics altered by straw removal management in the sugarcane-expansion regions in Brazil. *Soil Res* 57, 41–52. <https://doi.org/10.1071/SR17298>

Wang, D., Zhong, L., Zhang, C., Li, S., Tian, P., Zhang, F., Zhang, G., 2019. Eco-friendly synthesis of a highly efficient phosphorus flame retardant based on xylitol and application on cotton fabric. *Cellulose* 26, 2123–2138. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2193-5>

Wang, G., Wen, J., Li, H., Qiu, C., 2009. Biodegradation of phenol and *m*-cresol by *Candida albicans* PDY-07 under anaerobic condition. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36, 809–814. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0555-6>

Wang, H., Li, Q., Peng, Y., Zhang, Z., Kuang, X., Hu, X., Ayepa, E., Han, X., Abrha, G.T., Xiang, Q., Yu, X., Zhao, K., Zou, L., Gu, Y., Li, X., Li, X., Chen, Q., Zhang, X., Liu, B., Ma, M., 2020b. Cellular Analysis and Comparative Transcriptomics Reveal the Tolerance Mechanisms of *Candida tropicalis* Toward Phenol. *Front Microbiol* 11, 544. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00544/BIBTEX>

Wang, S., Cheng, G., Joshua, C., He, Z., Sun, X., Li, R., Liu, L., Yuan, Q., 2016. Furfural tolerance and detoxification mechanism in *Candida tropicalis*. *Biotechnol Biofuels* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0668-x>

Wang, S., He, Z., Yuan, Q., 2017c. Xylose enhances furfural tolerance in *Candida tropicalis* by improving NADH recycle. *Chem Eng Sci* 158, 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.09.026>

Wang, S., Li, H., Fan, X., Zhang, J., Tang, P., Yuan, Q., 2015a. Metabolic responses in *Candida tropicalis* to complex inhibitors during xylitol bioconversion. *Fungal Genet Biol* 82, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.022>

Wang, W., Ling, H., Zhao, H., 2015b. Steam explosion pretreatment of corn straw on xylose recovery and xylitol production using hydrolysate without detoxification. *Process Biochem* 50, 1623–1628. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2015.06.001>

Wang, X., Liang, Z., Hou, J., Shen, Y., Bao, X., 2017a. The absence of the transcription factor Yrr1p, identified from comparative genome profiling, increased vanillin tolerance

due to enhancements of abc transporters expressing, rRNA processing and ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol* 8, 367.

<https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00367/BIBTEX>

Wang, X., Tsang, Y.F., Li, Y., Ma, X., Cui, S., Zhang, T.A., Hu, J., Gao, M.T., 2017b. Inhibitory effects of phenolic compounds of rice straw formed by saccharification during ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresour Technol* 244, 1059–1067.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.096>

Wang, Z., Zhu, Y., Yu, H., Li, Z., 2020a. Simultaneously environmental-friendly exfoliation of boron nitride nanosheets and graphene and the preparation of high thermal conductivity nano-mixture composite membranes. *Mater Charact* 168, 110508-110515.

<https://doi.org/10.1016/j.matchar.2020.110508>

Watson, N.E., Prior, B.A., Lategan, P.M., Lussi, M., 1984. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb Technol* 6, 451–456. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(84\)90095-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(84)90095-4)

Werpy, T., Petersen, G., 2004. Top value added chemicals from biomass volume I — Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas [WWW Document]. URL <https://www.osti.gov/biblio/15008859> (Acessado em 14.01.2022)

Wong, T.W., Behl, M., Yusoff, N.I.S.M., Li, T., Wahit, M.U., Ismail, A.F., Zhao, Q., Lendlein, A., 2020. Bio-based composites from plant based precursors and hydroxyapatite with shape-memory capability. *Compos Sci Technol* 194, 108138-108147.

<https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2020.108138>

Yamakawa, C.K., Rivera, E.C., Kwon, H., Agudelo, W.E.H., Saad, M.B.W., Leal, J., Rossell, C.E.V., Bonomi, A., Maciel Filho, R., 2019. Study of influence of yeast cells treatment on sugarcane ethanol fermentation: Operating conditions and kinetics. *Biochem Eng J* 147, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2019.03.022>

Yang, J., Ding, M.Z., Li, B.Z., Liu, Z.L., Wang, X., Yuan, Y.J., 2012. Integrated phospholipidomics and transcriptomics analysis of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced tolerance to a mixture of acetic acid, furfural, and phenol. *Omi A J Integr Biol* 16, 374–386. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0127>

Yiannikouris, A., André, G., Poughon, L., François, J., Dussap, C.G., Jeminet, G., Bertin, G., Jouany, J.P., 2006. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with  $\beta$ -D-glucans. *Biomacromolecules* 7, 1147–1155. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bm050968t>

Zhang, K., Wells, P., Liang, Y., Love, J., Parker, D.A., Botella, C., 2019. Effect of diluted hydrolysate as yeast propagation medium on ethanol production. *Bioresour Technol* 271, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.080>

Zhang, Y., Han, B., Ezeji, T.C., 2012. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. *N Biotechnol* 29, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.09.001>