

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Programa de Pós-Graduação em biocombustíveis**

**Myrlene de Oliveira Ottone**

**AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS PARA PRODUÇÃO DE  
BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DA FRAÇÃO C5 DISPONÍVEL NA  
TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO**

**Diamantina**

**2022**

**AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS PARA PRODUÇÃO DE  
BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DA FRAÇÃO C5 DISPONÍVEL  
NA TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lílian de Araújo Pantoja  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos

**Diamantina**

**2022**

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

O91a OLIVEIRA OTTONE, MYRLENE  
2022 AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS PARA PRODUÇÃO DE  
BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DA FRAÇÃO C5 DISPONÍVEL  
NA TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO [manuscrito] / MYRLENE OLIVEIRA  
OTTONE. -- Diamantina, 2022.  
110 p. : il.

Orientador: Prof. Lilian de Araújo Pantoja.  
Coorientador: Prof. Alexandre Santos Soares.

Tese (Doutorado em Biocombustíveis) -- Universidade Federal  
dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação  
em Biocombustíveis, Diamantina, 2022.

1. Etanol lignocelulósico,. 2. xilose,. 3. via da pentoses  
fosfato,. 4. biocombustíveis,. 5. bioprocessos.. I. Pantoja,  
Lilian de Araújo. II. Soares, Alexandre Santos. III.  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV.  
Título.


Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Este produto é resultado do trabalho conjunto entre o bibliotecário Rodrigo Martins Cruz/CRB6-  
2886  
e a equipe do setor Portal/Diretoria de Comunicação Social da UFVJM

**AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DA FRAÇÃO C5 DISPONÍVEL NA TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO**


Tese apresentada ao DOUTORADO EM BIOCOMBUSTÍVEIS, nível de DOUTORADO como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM BIOCOMBUSTÍVEIS

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lílian De Araújo Pantoja


Data da aprovação : 20/06/2022

Documento assinado digitalmente  
 LILIAN DE ARAUJO PANTOJA  
Data: 28/09/2022 10:42:10-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>


Prof.Dr.<sup>a</sup> LÍLIAN DE ARAÚJO PANTOJA - UFVJM

Documento assinado digitalmente  
 VIVIAN MACHADO BENASSI  
Data: 20/09/2022 13:23:30-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.Dr.<sup>a</sup> VIVIAN MACHADO BENASSI - UFVJM


Documento assinado digitalmente  
 DAVID LEE NELSON  
Data: 20/09/2022 20:33:18-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.Dr. DAVID LEE NELSON - UFVJM

Documento assinado digitalmente  
 VERONICA FERREIRA MELO  
Data: 19/09/2022 09:32:06-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.Dr.<sup>a</sup> VERÔNICA FERREIRA MELO - IFRJ

Prof.Dr. PATRICK GOMES DE SOUZA - INPA

Documento assinado digitalmente  
 PATRICK GOMES DE SOUZA  
Data: 21/09/2022 18:59:46-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

**Dedico essa tese primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida,  
autor de meu destino, aos meus pais (*in memoriam*) e ao meu marido por  
não me fazer desistir desse sonho.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço minha tese de doutorado aos meus pais (*in memoriam*), que me ensinaram tanto e tornaram possível a realização deste grande sonho em minha vida.

Agradeço a toda a minha família, que na minha vida inteira me deu suporte e incentivo para que eu alcançasse meus sonhos.

Agradeço aos meus irmãos, que além de estarem ao meu lado em todos os momentos da vida, sendo sempre minha inspiração.

Agradeço aos meus orientadores, Dr<sup>a</sup> Lilian Pantoja e Dr Alexandre Soares, que souberam me conceder todo o caminho correto para o desenvolvimento deste trabalho e ter-me transformado em sua filha por todo esse tempo.

Agradeço ao meu marido, meu maior parceiro de vida, obrigada por estarmos juntos, sempre juntos. Em momentos de alegrias, tristezas, de fortunas ou pobreza. Simplesmente, obrigada!

Agradeço a toda equipe do LabBBio! Sem o apoio e amizade de vocês, a realização deste sonho não seria possível.

Agradeço a CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

A busca por micro-organismos capazes de fermentar todos os açúcares presentes no hidrolisado lignocelulósico, mesmo na presença de inibidores celulares liberados durante o pré-tratamento das biomassas, se apresenta como um dos principais desafios para a consolidação do processo de produção do bioetanol de segunda geração. Neste contexto, o presente estudo tem a finalidade de avaliar o desempenho das linhagens *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, *Candida akabanensis* UFVJM-R131 e *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G utilizando o hidrolisado ácido da torta de caroço de algodão em condições operacionais estudadas em meio sintético. Ao final dos ensaios, a linhagem *Candida akabanensis* UFVJM-R131 obteve o melhor rendimento de 0,24 g g<sup>-1</sup> de etanol em hidrolisado lignocelulósico, se destacando dentre as demais linhagens de leveduras estudadas. Diante dos resultados obtidos, a *C. akabanensis* UFVJM-R131 possuem um grande potencial para a produção de bioetanol a partir de biomassas recalcitrantes.

**Palavras chave:** Etanol lignocelulósico, xilose, via da pentoses fosfato, biocombustíveis, bioprocessos.

## **ABSTRACT**

The microorganism by microorganisms presents the challenges of fermenting all the sugars in the bioethane production process released during the pre-treatment of biomass, it presents itself as one of the main for the production of bioethane generation. In this context, we present the study of the UFVJM-R10 strain, the geotric study of *Candida orthopsilos* UFVJM-R13 and *Candida orthopsilos* using the hydrolyzed study of cottonseed cake in synthetic medium. At the end of the tests, the *Candida akabanensis* UF gVM-R131 strain had the best yield of 0.24 g. Lignocellulosic stands out, standing out among the other hydrolyzed yeast strains. In view of the results obtained, *C. akabanensis* UFVJM-R131 has great potential for the production of bioethanol from recalcitrant biomass.

**Keywords:** Lignocellulosic ethanol, xylose, via pentose phosphate, biofuels, bioprocesses.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: História e Projeções sobre a demanda mundial por fontes de energias até o ano de 2050. ....	16
Figura 2: Esquema ilustrativo da estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal. ....	21
Figura 3: Esquema dos pré-tratamentos na estrutura da biomassa lignocelulósica. ....	22
Figura 4: Esquema geral dos princípios inibidores gerados a partir do material lignocelulósico durante o pré-tratamento ácido. ....	25
Figura 5: Esquema dos principais efeitos dos inibidores na célula. ....	26
Figura 6: Evolução dos estudos sobre fermentadores de pentoses. ....	29
Figura 7: Esquema representativo das vias metabólicas envolvidas na conversão de xilose a formação do etanol. ....	31
Figura 8: Representação esquemática da célula de levedura. ....	32
Figura 9: Fluxograma da metodologia da produção de etanol utilizando as linhagens fermentadoras de pentoses. ....	40
Figura 10: Fluxograma da obtenção e tratamento físico da torta de caroço de algodão. ....	41
Figura 11: Fluxograma da obtenção e caracterização química dos hidrolisados. ....	42
Figura 12: Desenho esquemático da câmara de Neubauer evidenciando a área de contagem. ....	50
Figura 13: Fluxograma da quarta etapa: fermentação utilizando diferentes hidrolisados hemicelulósicos para produção de etanol utilizando linhagens fermentadoras de D-xilose. ....	56
Figura 14: Aspecto macroscópico e microscópica das linhagens de leveduras A) <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G, B) <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10 e C) <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131 com 7 dias e 48 horas de cultivo em meio YEP MX, respectivamente. Imagens com aumento de 100x e barra de escala = 5µm. ....	61
Figura 15: Perfil do crescimento celular das linhagens A) <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10, B) <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131 e C) <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G em meio sintético (OLIVEIRA; 2010) a 28°C, 150 rpm e por 29 horas. ....	63
Figura 16: Curvas de correlação entre concentração celular em massa seca (g) e densidade ótica a 610 nm para as linhagens de A) <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10, B) <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131, C) <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G. ....	63
Figura 17: Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G conduzida a 150 rpm nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C. ....	65
Figura 18: Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10 conduzida a 150 rpm nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C. ....	67

Figura 19: Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131 conduzida a 150 rpm nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C. ....	68
Figura 20: Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G conduzida a 28°C nas velocidades de agitação de 150 rpm, 100 rpm e 50 rpm.....	70
Figura 21: Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10 conduzida a 28°C nas velocidades de agitação de 150 rpm, 100 rpm e 50 rpm. ....	72
Figura 22: Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131 conduzida a 28°C nas velocidades de agitação de 150 rpm, 100 rpm e 50 rpm. ...	74
Figura 23: Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G conduzida a 28°C, 100 rpm nos pH 4.2, 5.2 e 6.2 .....	76
Figura 24: Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10 conduzida a 28°C, 100 rpm nos pH 4.2, 5.2 e 6.2. ....	78
Figura 25: Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131 conduzida a 28°C, 100 rpm nos pH 4.2, 5.2 e 6.2. ....	80
Figura 26: Cinética dos processos fermentativos utilizando as linhagens de leveduras nos hidrolisados com o pH 6.2: A) destoxificado e B) não destoxificado conduzida a 28°C e 100 rpm. ....	82
Figura 27: Cinética fermentativas da linhagem de levedura <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G no hidrolisado ácido de torta de algodão destoxificado e não destoxificado com o pH 6.2 conduzida a 28°C por 100 rpm.....	83
Figura 28: Cinética fermentativa da linhagem de levedura <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10 no hidrolisado ácido de torta de algodão destoxificado e não destoxificado com pH 6.2 conduzida a 28°C e 100 rpm. ....	86
Figura 29: Cinética fermentativa da linhagem de levedura <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131 no hidrolisado ácido de torta de algodão destoxificado e não destoxificado com o pH 6.2 a 28°C por 100 rpm. ....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Padrões utilizados na quantificação dos compostos químicos.....	46
Tabela 2: Condições operacionais das análises realizadas por CLAE para determinação de açúcares e inibidores tóxicos provenientes do pré-tratamento químico ácido na torta de caroço de algodão. ....	46
Tabela 3: Padrões utilizados para a quantificação de xilitol e etanol pela técnica CLAE.....	52
Tabela 4: Condições operacionais das análises realizadas por CLAE para determinação de açúcares e álcool.....	52
Tabela 5: Composição química da torta de caroço de algodão antes e após o pré-tratamento químico.....	58
Tabela 6: Balanço de massa da fração sólida resultante do pré-tratamento ácido da torta de caroço de algodão .....	59
Tabela 7: Composição química do hidrolisado ácido hemicelulósico proveniente da torta de algodão após o pré-tratamento químico com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluído (destoxificado e não destoxificado).....	59
Tabela 8: Tamanho das linhagens <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10, <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131, <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G estudadas durante 7 dias, no meio YEPMX....	60
Tabela 9: Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G, a 150 rpm conduzidos em temperaturas 26°C, 28°C e 30°C por 72 h.....	66
Tabela 10: Resultados dos Parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G, a 150 rpm conduzidos nas temperaturas 26°C, 28°C e 30°C. ....	66
Tabela 11: Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10, a 150 rpm conduzidos em temperaturas 26°C, 28°C e 30°C por 72 h. ....	67
Tabela 12: Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10, a 150 rpm conduzidos nas temperaturas 26°C, 28°C e 30°C. ....	68
Tabela 13: Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131, a 150 rpm conduzidos em temperaturas 26°C, 28°C e 30°C por 72 h. ....	69
Tabela 14: Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131, a 150 rpm conduzidos nas temperaturas 26°C, 28°C e 30°C. ....	69

Tabela 15: Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G conduzidos a 28°C e diferentes velocidades de agitação por 72 e 96 h.....	71
Tabela 16: Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G, conduzidos nas temperaturas 28°C e diferentes velocidades de agitação.....	71
Tabela 17: Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10 conduzidos a 28°C e diferentes velocidades de agitação por 72 e 96 h.....	73
Tabela 18: Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10, conduzidos nas temperaturas 28°C e diferentes velocidades de agitação.....	73
Tabela 19: Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131 conduzidos a 28°C e diferentes velocidades de agitação por 72 e 96 h.....	75
Tabela 20: Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131, conduzidos nas temperaturas 28°C e diferentes velocidades de agitação.....	75
Tabela 21: Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G conduzidos por 100 rpm a 28°C nos diversos pH e 96 h.....	77
Tabela 22: Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G, conduzidos por 100 rpm a 28°C nos diversos pH.....	77
Tabela 23: Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10 conduzidos por 100 rpm a 28°C nos diversos pH e 96 h.....	78
Tabela 24: Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10, conduzidos por 100 rpm a 28°C nos diversos pH.....	79
Tabela 25: Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131 conduzidos por 100 rpm a 28°C nos diversos pH e 96 h.....	80

Tabela 26: Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131, conduzidos por 100 rpm a 28°C nos diversos pH. ....	81
Tabela 27: Compostos químicos presentes no hidrolisado ácido hemicelulósico destoxificado e não destoxificado antes e após a fermentação com pH 6.2 utilizando a linhagem de <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-R131 a 28°C por 100 rpm .....	84
Tabela 28: Resultado dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-R131 no hidrolisado lignocelulósico com pH 6.2, a 28°C por 100 rpm. ....	85
Tabela 29: Compostos químicos presentes no hidrolisado ácido hemicelulósico destoxificado e não destoxificado antes e após a fermentação com pH 6.2 utilizando a linhagem de <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10 a 28°C por 100 rpm. ....	86
Tabela 30: Resultado dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10 no hidrolisado lignocelulósico com pH 6.2, a 28°C por 100 rpm. ....	87
Tabela 31: Compostos químicos presentes no hidrolisado ácido hemicelulósico destoxificado e não destoxificado antes e após a fermentação com pH 6.2 utilizando a linhagem de <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131 a 28°C por 100 rpm. ....	88
Tabela 32: Resultado dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131 no hidrolisado lignocelulósico com pH 6.2, a 28°C por 100 rpm. ....	89

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>14</b>
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 Bioetanol</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2 Biomassas lignocelulósicas</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3 Processos hidrolíticos</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3.1 Pré-tratamento</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3.2 Pré-tratamento por via química</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3.3 Compostos inibidores formados na etapa de pré-tratamento</b> .....	<b>24</b>
<b>3.4 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico</b> .....	<b>27</b>
<b>3.5 Micro-organismos fermentadores de pentoses</b> .....	<b>28</b>
<b>3.5.1 Metabolismo</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5.2 Leveduras fermentadoras de pentoses</b> .....	<b>32</b>
<b>3.6 Parâmetros Fermentativos</b> .....	<b>38</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1 Matéria-prima</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.1 Obtenção da matéria-prima</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.2 Tratamento físico da biomassa lignocelulósica</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.3 Caracterização química da biomassa lignocelulósica</b> .....	<b>42</b>
<b>4.2 Obtenção do hidrolisado lignocelulósico por hidrólise química ácida</b> .....	<b>42</b>
<b>4.2.1 Preparo do hidrolisado hemicelulósico</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2.2 Caracterização química do resíduo sólido</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2.3 Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico</b> .....	<b>46</b>
<b>4.3 Destoxificação do hidrolisado ácido da torta de caroço de algodão</b> .....	<b>46</b>
<b>4.3.1 Procedimento de destoxificação do hidrolisado</b> .....	<b>46</b>
<b>4.3.2 Caracterização dos compostos presentes no hidrolisado hemicelulósico destoxificado</b> .....	<b>47</b>
<b>4.4 Micro-organismos</b> .....	<b>47</b>
<b>4.4.1 Aquisição, reativação e manutenção dos micro-organismos</b> .....	<b>47</b>
<b>4.4.2 Autenticação dos micro-organismos</b> .....	<b>48</b>
<b>4.4.5 Perfil de crescimento dos Micro-organismos</b> .....	<b>48</b>
<b>4.4.6 Investigação dos parâmetros fermentativos</b> .....	<b>50</b>

<b>4.5 Processo fermentativo utilizando hidrolisado lignocelulósico .....</b>	<b>55</b>
<i>4.5.1 Preparo do inóculo.....</i>	<i>56</i>
<b>4.6 Análises estatísticas .....</b>	<b>57</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>5.1 Caracterização química do resíduo sólido remanescente do pré-tratamento da torta do caroço de algodão .....</b>	<b>58</b>
<b>5.2 Caracterização química do hidrolisado ácido da torta de caroço de algodão: não destoxificado e destoxificado .....</b>	<b>59</b>
<b>5.3 Micro-organismos .....</b>	<b>60</b>
<i>5.3.1 Autenticação dos micro-organismos .....</i>	<i>60</i>
<i>5.3.2 Perfil de crescimento das linhagens .....</i>	<i>62</i>
<i>5.3.3 Investigação dos parâmetros fermentativos para a melhoria na produção de etanol. ....</i>	<i>64</i>
<b>5.4 Processo Fermentativo.....</b>	<b>82</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>7 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>91</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda de energia, atrelado ao aquecimento global e às alterações climáticas, tem motivado diferentes países a desenvolverem políticas e medidas que incentivem a utilização de fontes energéticas renováveis (ARUMUGAM *et al.*, 2021). Nas últimas décadas, uma fonte de energia renovável e sustentável que vem sendo largamente estudada é aquela produzida a partir de biomassas lignocelulósicas, conhecida por bioetanol de segunda geração. Tais biomassas, além de agregar valor à resíduos que seriam descartados sem destino (SADHUKHAN *et al.* 2019; FAUSTINE *et al.*, 2021; MAITY e MALLICK; 2022); reduzem as emissões de gases do efeito estufa (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2012; TOOR *et al.*, 2020; VASIC *et al.*, 2021), não competem por fontes alimentares (ZUCARO *et al.*, 2018) e ainda, podem influenciar de forma positiva na economia agroindustrial (LIU *et al.*, 2019, ARUMUGAM *et al.*, 2021).

Os principais componentes químicos da biomassa lignocelulósica são polímeros complexos, compostos por carboidratos monoméricos (KO; LEE, 2016; MAHBOUBI *et al.*, 2020). Para a produção de bioetanol utilizando a biomassa lignocelulósica, os micro-organismos precisam ter acesso aos carboidratos monoméricos livres (YOO *et al.*, 2020), por isso, essa complexidade é quebrada pela etapa conhecida por pré-tratamento, que é realizada por diferentes metodologias, tais como as físicas, biológicas, térmicas e químicas (HENDRIKS, ZEEMAN, 2009; ZHAO *et al.*, 2009; SADHUKHAN *et al.*, 2019; VASIC *et al.*, 2021).

As condições severas do pré-tratamento, além de serem capazes de liberar os carboidratos monoméricos, podem formar ainda, compostos químicos que inibem o processo fermentativo, tais como os ácidos orgânicos fracos, principalmente o ácido acético, bem como os derivados de furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) e os compostos fenólicos (LI *et al.*, 2019; MISHRA; GHOSH, 2019; WANG *et al.*, 2019; DIONÍSIO *et al.*; 2021; VANMARCKE *et al.*, 2021; TAVARES *et al.*; 2022). O tipo e a concentração dos inibidores gerados na etapa de pré-tratamento, dependem da composição da biomassa e das condições de operação realizadas (MOSIER *et al.*, 2005; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; KRASZNAI *et al.*, 2018; VANMARCKE *et al.*, 2021).

Visando minimizar os efeitos desses inibidores nos micro-organismos durante o processo fermentativo, algumas etapas estratégicas podem ser empregadas, tais como a destoxificação, adaptação das linhagens naturais às condições adversas do hidrolisado lignocelulósico, modificação genética de micro-organismos e co-cultura (PARAWIRA; TEKERE, 2011; ROQUE *et al.*, 2019; ALVES-FERREIRA *et al.*; 2022). Dentre essas, a destoxificação geralmente é a estratégia mais empregada nos processos de produção do etanol lignocelulósico, responsável pela



remoção total ou parcial dos compostos citotóxicos formados no pré-tratamento (BRITO *et al.*, 2017, CANDIDO *et al.*, 2020; TAVARES *et al.*; 2022).

O aproveitamento integral dos açúcares provenientes deste processo também pode afetar diretamente o rendimento final do etanol lignocelulósico (ISHOLA *et al.*, 2015; ARORA *et al.*, 2020), pois atualmente, não existem relatos de linhagens naturalmente ocorrentes que consigam metabolizar todos os açúcares provenientes de hidrolisados lignocelulósicos a etanol com o mesmo desempenho da consagrada levedura fermentadora de hexose, *Saccharomyces cerevisiae* (LANE *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2020; TRAN *et al.*, 2020; DIONÍSIO *et al.*; 2021; TAVARES *et al.*; 2022). Nos últimos anos, devido ao alto desempenho em processos industriais, vários trabalhos buscaram o melhoramento genético dessa espécie, a fim de desenvolver a habilidade dessa, na conversão, além das hexoses, também das pentoses, mesmo na presença dos compostos químicos citotóxicos (LANE *et al.*, 2020).

Uma alternativa para o aproveitamento integral dos açúcares provenientes das biomassas lignocelulósicas, seria a busca por micro-organismos naturais com a capacidade de converter as pentoses em etanol (TAVARES *et al.*; 2022). Valinhas *et al.* (2018) visando essa alternativa, caracterizaram e identificaram linhagens de leveduras capazes de fermentar a D-xilose em etanol, tais como *Candida akabanensis* UFVJM R10 e *Galactomyces geotrichum* UFVJM R131. Apesar dos valores de rendimento e produtividade do etanol produzido terem apresentados inferiores aos consultados na bibliografia, tais espécies ainda não haviam sido relacionadas na literatura como potenciais micro-organismos produtores de bioetanol.

Matos *et al.* (2017) também estudando essas linhagens, observaram a capacidade dessas em converter os açúcares disponíveis na fração líquida do hidrolisado de torta de girassol, mesmo na presença de inibidores celulares. Todavia, tais estudos se restringiram a uma única biomassa, sendo então, incentivador estudar as respostas para outras matérias-primas, bem como testar outras leveduras detentoras do potencial de fermentação de pentoses, que ainda não foram relacionadas na literatura como produtoras de bioetanol. Diante do exposto, o presente estudo visou contribuir com informações que ampliou o leque de conhecimento sobre o potencial de novas linhagens fermentadoras de pentoses para a conversão dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico da torta de caroço de algodão à bioetanol.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Estudar a produção de bioetanol de segunda geração a partir do hidrolisado ácido da torta do caroço de algodão utilizando diferentes linhagens de leveduras fermentadoras de pentoses pré-selecionadas.

### 2.2 Objetivos Específicos

I. Caracterizar a fração solúvel oriunda da hidrólise ácida das biomassas lignocelulósicas avaliadas torta de caroço de algodão.

II. Caracterizar e comparar os aspectos químicos e físico-químicos do resíduo agroindustrial antes e após o pré-tratamento ácido.

III. Conhecer os perfis de crescimentos das linhagens de leveduras *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, *Candida akabanensis* UFVJM-R131 e *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G, bem como a produção de etanol em meio sintético e diferentes parâmetros fermentativos (pH, temperatura e velocidade de agitação)

IV. Avaliar o potencial das linhagens de leveduras *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, *Candida akabanensis* UFVJM-R131 e *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G para a produção de etanol a partir da conversão de pentoses presentes na fração solúvel oriunda da hidrólise ácida da torta do caroço de algodão.

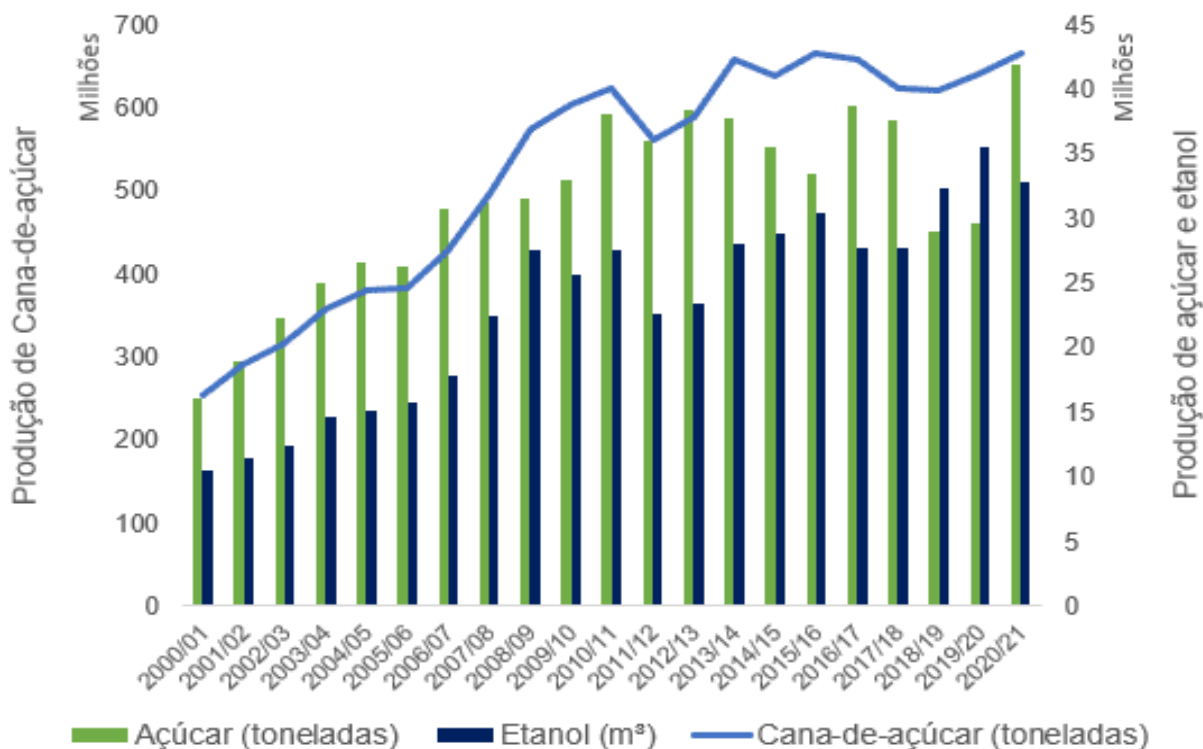
V. Examinar o efeito dos inibidores formados na etapa de hidrólise ácida das biomassas vegetais sobre as linhagens *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, *Candida akabanensis* UFVJM-R131 e *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G.

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Bioetanol**

O crescimento na demanda global por energia juntamente com o aumento na conscientização dos impactos ambientais, econômicos e sócio-políticos, pelo uso excessivo dos combustíveis convencionais, motivaram estudos para a consolidação das fontes de energia mais sustentáveis e renováveis (LORENZI; ANDRADE, 2019; MACHINENI, 2019; MAHBOUBI *et al.*, 2020; DEVI *et al.*, 2022). Segundo a Agência Internacional de Energia (AIE), o consumo global de energia elétrica cresceu 2,3% em 2018, sendo considerado o avanço mais rápido em uma década, quase o dobro da taxa média de crescimento desde 2010. Esse consumo desencadeou o crescimento médio anual nas emissões de carbono em 2018 de 2,1%, sendo considerando o maior aumento dentre os últimos 10 anos. Conforme essa mesma agência, as emissões globais de dióxido de carbono relacionadas à energia aumentaram em 2022 6% em relação à 2021, com total de 36,3 bilhões de toneladas de CO<sub>2</sub>, sendo este nível de emissão o mais alto de todos os tempos. Esse aumento se deve principalmente à forte recuperação da economia mundial causada pela crise do Covid-19, no qual dependeu fortemente do carvão para impulsionar esse crescimento.

Conforme dados relatados pela British Petroleum Company (2021), as fontes de energia renováveis estão crescendo rapidamente e espera-se que sejam a principal fonte de energia até 2050. De acordo com essa companhia as medidas adotadas para restringir a propagação do coronavírus, conhecido por Covid-19, proporcionaram um vislumbre de um mundo mais limpo e com menos carbono, devido a melhora na qualidade do ar em muitas das cidades mais poluídas do mundo. No ano de 2020, a AIE estima que as emissões globais de CO<sub>2</sub> tenham caído em até 2,6 gigatoneladas, devido à redução da demanda anual de energia em aproximadamente 1,5% a cada mês de isolamento ao redor do planeta. Segundo British Petroleum Company (2022), o mundo exige reduções semelhante nas emissões de carbono, para conseguir chegar a zero os teores de carbonos até o ano 2050. Esse autor relata ainda que para atingir essa marca de zero teores, necessita ser implementando toda a gama de energias e tecnologias com zero ou baixo teor de carbono, tais como eletrificação, hidrogênio, bioenergia e energias renováveis



Fonte: ADMINISTRAÇÃO DE INFORMAÇÕES ENERGÉTICAS DOS BRASIL 2021.

**Figura 1:** Produção Brasileira de Cana-de-açúcar, Açúcar e Etanol. Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Uma energia renovável amplamente utilizada é o biocombustível, capaz de desempenhar um papel significativo na obtenção do desenvolvimento sustentável e no aumento da segurança energética (ANANTHI *et al.*, 2021). De acordo com Kumar *et al.* (2020), os biocombustíveis são subdivididos em quatro gerações, sendo elas: a) A primeira geração, aqueles provenientes de fontes alimentares, tais como amilácea, açucaradas e oleoginosas; b) A segunda geração, aqueles que utilizam culturas não alimentares, ditas biomassas lignocelulósicas; c) A terceira geração, aqueles derivados principalmente de microalgas; d) A quarta geração, aqueles que utilizam plantas e micro-organismos geneticamente modificados com alta capacidade de captura de carbono.

Nas últimas décadas, um biocombustível que vem sendo apreciado pelo mercado de energia é o bioetanol, conforme demonstrado na figura 1 (JONSSON; MARTIN, 2016; KAMOLDEEN *et al.*, 2017; ROBAK; BALCEREK, 2018; TRAN *et al.*, 2020; DIONÍSIO *et al.*, 2021; TAVARES *et al.*, 2022; MAITY e MALLICK, 2022). A comercialização desse biocombustível se torna interessante, pois pode garantir ao setor de transporte recursos limpos (AYODELE *et al.*, 2020; VANMARCKE *et al.*, 2021), bem como, ser utilizado na sua forma pura ou misturado à gasolina, promovendo o elevado número de octanas e do calor de

vaporização (SRIVASTAVA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2020; DAS *et al.*, 2021; MAITY e MALLICK; 2022).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento- CONAB (2021), o Brasil é o maior produtor mundial de bioetanol proveniente da cana-de-açúcar e espera-se que haja um aumento dessa produção, devido a safra de 2020/2021 de cana-de-açúcar ser em torno de 643,00 milhões de toneladas, quantidade superior a safra anterior que foi de 635,51 milhões de toneladas. Dessa forma, as unidades produtoras de etanol têm procurado otimizar seus processos de produção, com o intuito de elevar a eficiência dos sistemas operacionais (CONAB, 2021).

O bioetanol pode ser produzido, além da cana-de-açúcar, por diversas matérias-primas e dentre essas, a biomassa lignocelulósica vem se destacando, por ser considerada uma fonte de carbono amplamente encontrada na natureza (YOO *et al.*, 2020; VASIC *et al.*, 2021). De acordo Liu *et al.* (2019), a utilização dessa biomassa, pode evitar a competição com o suprimento alimentício, ser constituída de fontes relativamente baratas e, ainda, poder estimular a economia nas áreas rurais.

O etanol lignocelulósico denominado de etanol de segunda geração, desperta um interesse potencial na área de bioenergia e possui vantagens em relação aos combustíveis a base do petróleo e ao etanol de primeira geração (SPATARI *et al.*, 2010; SINGHVI; GOKHALE, 2019; DAS *et al.*, 2021; MAITY e MALLICK; 2022). De acordo com Liu *et al.* (2020), em seu estudo do ciclo de vida do bioetanol lignocelulósico, uma dessas vantagens seria a alta redução nas taxas de emissões de gases do efeito estufa.

Conforme Dionísio *et al.*; (2021), a integração entre o processo convencional de produção de etanol a partir de caldo e melaço de cana-de-açúcar (primeira geração) e o processo com aproveitamento da biomassa (segunda geração) ocasionaria redução nos custos fixos de produção, justamente pelas operações unitárias comuns a ambos os processos. Esses autores ainda relatam que o desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol de segunda geração, ou etanol celulósico, torna-se econômica e estrategicamente atrativa.

O interesse na produção de combustíveis líquidos a partir da biomassa lignocelulósica é uma necessidade real, pois como relatado por Kumar *et al.* (2020), a energia é um fator crítico responsável pelo desenvolvimento socioeconômico de um país. Contudo, a concretização do uso do etanol lignocelulósico ainda é comprometida por vários obstáculos, incluindo, os efeitos do pré-tratamento, a liberação eficiente de açúcares do material lignocelulósico, o aumento das taxas de rendimento e eficiência do processo fermentativo, bem como, linhagens microbianas

eficientes na conversão de todos os açúcares presentes no bioprocesso à etanol, ou, que são tolerantes aos inibidores formados na etapa de pré-tratamento e ao próprio etanol produzido (SILVA, 2012; HASSAN *et al.*, 2019; TOOR *et al.*, 2020) .

### 3.2 Biomassas lignocelulósicas

O termo biomassa é definido como todo recurso renovável de origem vegetal ou animal que provem da matéria orgânica, podendo ser empregada na produção de energia (ANEEL, 2008; PÉREZ-PIMIENTA *et al.*, 2017; DAS *et al.*, 2021). No amplo contexto da bioenergia, a produção de biocombustíveis líquidos a partir de biomassa tem sido apreciada para atender particularmente às necessidades de transporte veicular (REZANIA *et al.*, 2020; MAITY e MALLICK; 2022). Nesse sentido, os estudos focados na produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos se tornam relevantes para contribuir na consolidação da matriz energética (CHAVES; GOMES, 2014; VASIC *et al.*, 2021).

O bioetanol é produto tecnológico proveniente de qualquer biomassa vegetal, como aquelas provenientes da monoculturas (cana-de-açúcar, milho, soja, colza, gramíneas e álamo híbrido), resíduos de biomassa (palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de sorgo sacarino, palha de arroz, torta de dendê, torta de caroço de algodão, torta de macaúba); resíduos de florestas (madeiras, cavacos e serragem) e resíduos sólidos urbanos (papel processado e jornal) (CHANDEL *et al.*, 2011; ARORA *et al.*, 2020; TOOR *et al.*, 2020).

A valorização dos resíduos provenientes das cadeias agrícolas ou agroindustriais, vem se destacando no fornecimento de matérias-primas para a produção de bioetanol (DIAS *et al.*, 2018; TOOR *et al.*, 2020) como, o bagaço de cana-de açúcar (LOPES *et al.*, 2017; LAMOUNIER *et al.*, 2020), a palha e sabugo de milho (DOS SANTOS-ROCHA *et al.*, 2017; DU *et al.*, 2020; ARUMUGAM *et al.*, 2021), a palha de trigo (SILVA, 2018; FATMA *et al.*, 2020; HERMOSILLA *et al.*, 2020), a torta de semente de girassol (MATOS *et al.*, 2018), a torta de mamona (MELO *et al.*, 2008, SANTOS *et al.*, 2015), a torta de pinhão-manso (SANTOS *et al.*, 2018) e a torta de dendê (BRITO *et al.*, 2017).

Dentre estas matérias-primas, merecem destaque a torta de algodão é um coproduto oriundo da planta *Gossypium hirsutum L.*, que representa importante fonte energética para a produção de bioetanol (BANO; IRFAN, 2019). De acordo com Dimos *et al.* (2019), o algodoeiro é uma cultura que desempenha um papel fundamental nos assuntos econômicos, políticos e sociais do mundo, tendo uma produção de aproximadamente 26 milhões de toneladas por ano. Esses autores reportam ainda, que os subprodutos da produção de algodão, são gerados

em grandes volumes anualmente, aproximadamente 2 toneladas de matéria seca por hectare, sendo estes, importantes fontes de açúcar e com baixo custo. Bano; Irfan (2019) relatam que esses subprodutos têm alto teor de celulose, em torno de 58,50% e teores de hemicelulose e lignina de 14,40% e 21,50%, respectivamente, possuindo, portanto, alto potencial para ser utilizado na cadeia produtiva de bioetanol. Dimos *et al.* (2019) em seu estudo, obtiveram rendimentos de 52% de bioetanol utilizando a torta de algodão e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo assim considerada uma boa matéria-prima a ser empregada na produção de etanol.

A composição da biomassa é uma das variáveis diretas que afetam a eficiência da produção do biocombustível, sendo influenciadas por variações genéticas da planta e pelas condições ambientais expostas (LATIF; RAJOCA, 2001; KRISHNA *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2019). A composição estrutural da biomassa vegetal inclui uma rede composta de polímeros complexos como carboidratos, proteínas, sais minerais e compostos fenólicos (LEITÃO 2015; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2017; KRASZNAI *et al.*, 2018; MACHINENI, 2019), que fornece propriedades protetoras e estruturais à planta (SUN *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2020; MAHBOUBI *et al.*, 2020).

Considerando essa constituição, cerca de 90% da massa seca é composta por polímeros complexos, tais como celulose, hemicelulose e lignina, sendo os 10% restantes representados por compostos extrativos e minerais (GÍRIO *et al.*, 2010; CHEN, LEE, 2020). Desses componentes, a celulose e a hemicelulose se destacam como elementos promissores para a produção de biocombustíveis, pois podem ser convertidos a carboidratos monoméricos (D-glicose, D-xilose e L-arabinose) e, então, convertidos a bioetanol de segunda geração (VORHA *et al.*, 2014).

A celulose é um polímero linear constituído de unidades repetitivas de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e compõe cerca de 30 a 50% da massa seca da parede celular vegetal (STICKLEN, 2008; KRASZNAI *et al.*, 2018; MACHINENI, 2019). Este polímero é estabilizado por ligações de hidrogênio intermolecular entre os grupos hidroxilas das cadeias de celulose e, apresentam uma forte tendência em formar ligações de hidrogênio intramolecular (BINOD *et al.*, 2019; UMMALYMA *et al.*, 2020). As interações ocorrem entre as hidroxilas presentes nos monômeros da celulose, fato que contribui para o aumento da sua rigidez e insolubilidade na maioria dos solventes orgânicos (SIQUEIRA, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2017). Devido a essas interações, a celulose é um componente estrutural importante para as paredes celulares, sendo responsável pela força mecânica das plantas (ALEXANDRIDIS *et al.*,

2018). A solubilidade do polímero de celulose ocorre pela quebra simultânea da maioria das ligações glicosídicas, todavia, em temperaturas amenas, a celulose é insolúvel, tanto em água quanto em solventes orgânicos comuns (INGLE *et al.*, 2020).

A hemicelulose é um polímero heterogêneo composto quimicamente por pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-manose, D-glicose, D-galactose) e ácidos hexurônicos (ácido D-glucurônico, ácido D-4-O-metilgalacturônico e ácido D-galacturônico) e, dependendo da sua origem biológica está presente na parede celular compondo cerca de 15 a 35% da biomassa vegetal (KRASZNAI *et al.*, 2018; TOOR *et al.*, 2020). O principal componente presente na hemicelulose é a xilana, polissacarídeo formado por subunidades de D-xilose, que constitui cerca de 20 a 30% da biomassa de madeiras duras e plantas herbáceas (GRAY *et al.*, 2006; GÍRIO *et al.*, 2010; HOUFANI *et al.*, 2020) e cerca de 50% em tecidos de gramíneas e cereais (GÍRIO *et al.*, 2010). As unidades de D-xilose se encontram na forma de xilopiranoses, conectadas entre si por ligações  $\beta$ -1,4, representando cerca de 80% dos açúcares totais da hemicelulose (FENGEL; WEGENER, 1989; CANILHA *et al.*, 2013; MACHINENI, 2019). A L-arabinose, representa cerca de 10% destes açúcares, e ao contrário da D-xilose, em que os estudos relacionados ao metabolismo têm sido conduzidos extensivamente visando a melhoria dos bioprocessos, este não tem recebido a devida atenção (YE *et al.*, 2019)

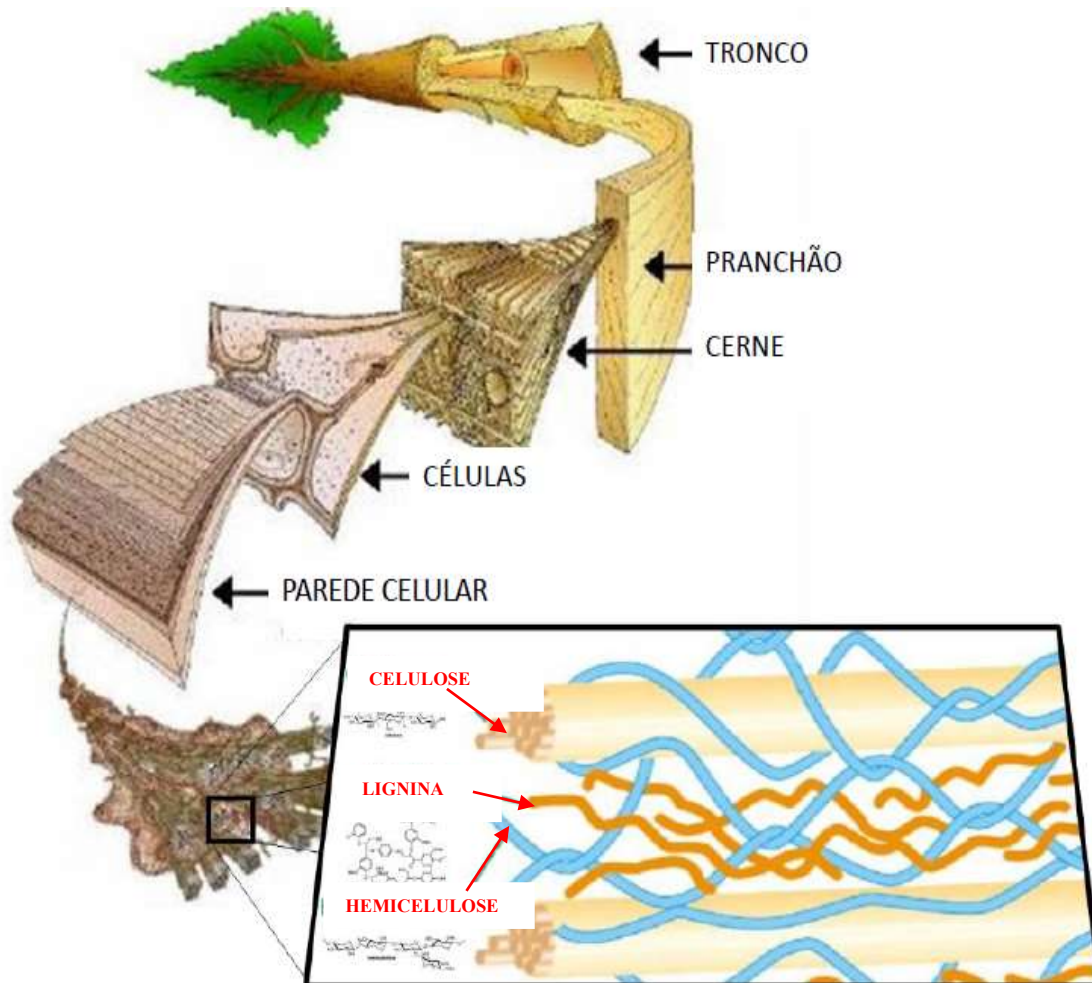
A lignina, representando cerca de 10 a 30% da biomassa vegetal (KRASZNAI *et al.*, 2018, MACHINENI, 2019) é um polímero complexo, amorfo e altamente ramificado constituído essencialmente por grupos aromáticos e alifáticos, tais como os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (ANWARA *et al.*, 2014; CHEN; WAN, 2017). A lignina se dispõe em uma rede tridimensional interligada entre os polímeros de polissacarídeo, que promove resistência a impactos e compressão, e ainda, impermeabilidade a parede celular das plantas (RAMIRES, 2010; SHAHZADI *et al.*, 2014; GORDOBIL *et al.*, 2016; YOO *et al.*, 2020).

Os compostos químicos presentes na biomassa lignocelulósica interagem intimamente entre si na construção da parede celular dos vegetais e, essas interações se encontram fortemente entrelaçadas através de ligações químicas (LEITÃO, 2015; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2017; MAHBOUBI *et al.*, 2020). As interações podem ser observadas na Figura 2, onde se apresenta esquematicamente a estrutura lignocelulósica.

O principal obstáculo para o uso dessa matéria-prima na sua conversão a etanol reside na natureza complexa e recalcitrante da parede celular das plantas (WANG *et al.*, 2019, HOUFANI *et al.*, 2020; VANMARCKE *et al.*, 2021). Neste sentido, o processo conhecido por



pré-tratamento deve ser realizado para a liberação dos açúcares monoméricos (TRAVAINI *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2020).



Fonte: CORRÉIA, 2011 (adaptada).

Figura 2: Esquema ilustrativo da estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal.

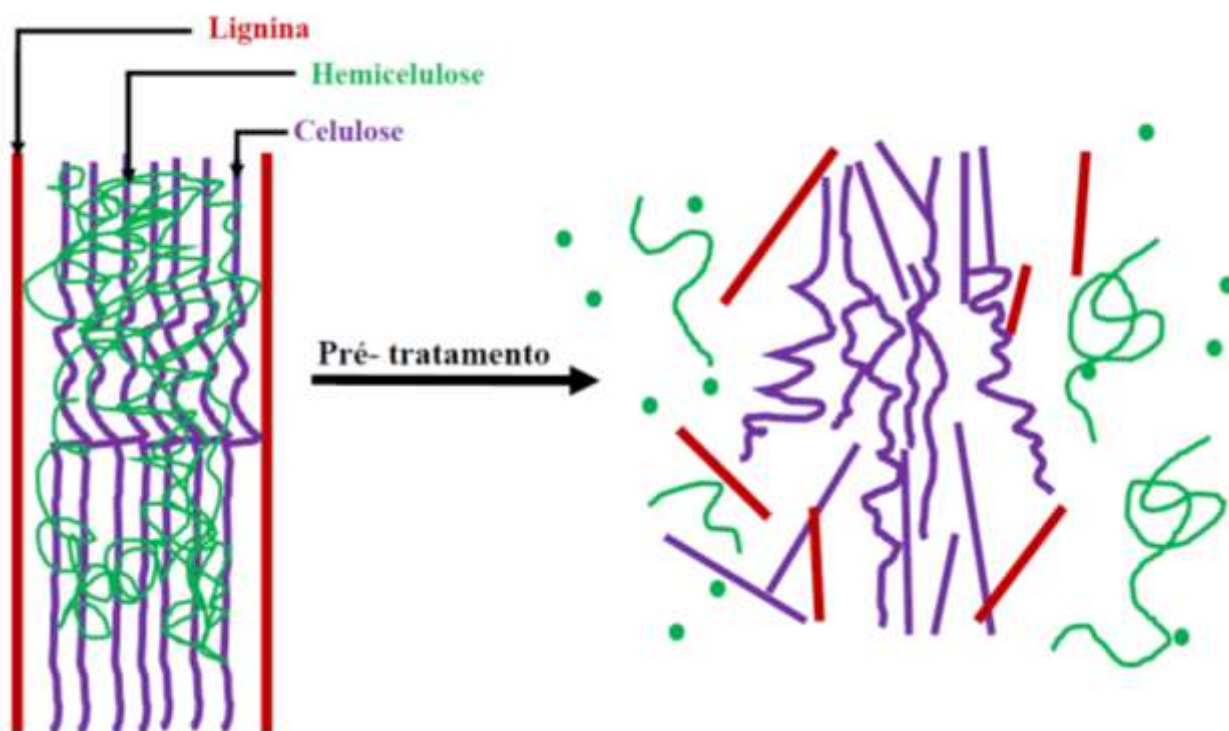
### 3.3 Processos hidrolíticos

#### 3.3.1 Pré-tratamento

A viabilidade econômica e consolidação do bioetanol lignocelulósico tem como requisito indispensável o emprego de todos os polissacarídeos presentes na constituição da matéria-prima lignocelulósica (PÉREZ-PIMIENTA *et al.*, 2017; TOOR *et al.*, 2020). Na bioconversão da biomassa em etanol, o pré-tratamento garante a desconstrução desse material em açúcares fermentescíveis, sendo considerado a etapa mais onerosa de todo o processo fermentativo (SADHUKHAN *et al.*, 2019).

A etapa de pré-tratamento é realizada com base nas características individuais das matérias-primas, uma vez que o material lignocelulósico apresenta diferentes propriedades

físico-químicas (WANG *et al.*, 2019). Nas últimas décadas, as metodologias utilizadas na dissociação dos monômeros fermentescíveis leva em consideração a estrutura da lignina, pois sua remoção aumenta a área superficial interna o que, conseqüentemente, permite o maior acesso das enzimas hidrolíticas a celulose (ARORA *et al.*, 2020). As metodologias podem ser concretizadas por métodos químicos, físicos, físico-químicos, biológicos e a combinação destes (SADHUKHAN *et al.*, 2019; BHATIA *et al.*, 2020). A Figura 3 demonstra o efeito desses métodos nos polímeros da biomassa lignocelulósica e o Quadro 1 mostra os principais métodos, as técnicas utilizadas, bem como as suas vantagens e desvantagens.



Fonte: MICROBEWIKI, 2016 (adaptada).

Figura 3: Esquema dos pré-tratamentos na estrutura da biomassa lignocelulósica.

A biomassa lignocelulósica quando submetida a etapa de pré-tratamento libera vários açúcares passíveis de fermentação, tais como, D-xilose, L-arabinose, D-manose, D-glicose, D-galactose (AWOYALE *et al.*, 2020). Neste contexto, o rendimento obtido do bioetanol dependerá das condições operacionais ideais, principalmente da escolha de uma técnica eficiente na etapa de pré-tratamento (MOOD *et al.*, 2013). No entanto, nenhum protocolo de pré-tratamento já existente é adequado para atender a variedade de biomassa disponível, pois, as tecnologias aplicadas geralmente são combinações de vários métodos, que visam

compensações para obter o máximo de açúcares com geração mínima de inibidores (ARORA *et al.*, 2020).

**Quadro 1:** Principais Técnicas utilizadas no pré-tratamento abordando suas vantagens e desvantagens.

Pré-tratamento			Vantagens	Desvantagens	Referências	
Métodos	Técnica	Ação				
Físico	Moinhos de bola	Trituração do material	Não produz inibidores celulares	Alto consumo de energia	VIDAL <i>et al.</i> (2011) GHAFAR <i>et al.</i> (2015)	
	Micro-ondas	Clivagem das ligações por alto calor	Geração mínima de inibidores	Alto consumo de energia	ARORA <i>et al.</i> (2020)	
	Campo elétrico pulsado	Explosão da biomassa em alta tensão	Técnica de fácil acesso com baixa energia por curta duração	Aumento nos teores dos polifenóis e proteínas	ARORA <i>et al.</i> (2020)	
Químico	Ácido	Diluído	Hidrolise das microfibrilas	Consumo baixo de ácido, menor corrosão do equipamento e redução dos processos industriais.	Formação alta de produtos de degradação	GÍRIO <i>et al.</i> (2010) ARORA <i>et al.</i> (2020)
		Concentrado	Hidrolise das microfibrilas	Opera em temperaturas baixas/médias, levando à redução dos custos operacionais e com formação baixa de produtos de degradação.	Gera alto teor de compostos ácidos e corrosivos	GÍRIO <i>et al.</i> (2010)
	Bases	Metais alcalinos	Clivagem das ligações covalentes e de hidrogênio	Remoção efetiva dos ésteres	Reagentes com altos custos	BJERRE <i>et al.</i> (1996) KLINKE <i>et al.</i> (2002)
		Metais alcalinos-terrosos	Transformação da lignina em CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O e ácidos carboxílicos.	Decompõe as cadeias laterais de ésteres e glicosídeos.		BJERRE <i>et al.</i> (1996) KLINKE <i>et al.</i> (2002) ARORA <i>et al.</i> (2020)
		Amônia	Clivagem das ligações covalentes e de hidrogênio			ALVIRA <i>et al.</i> (2010) ARORA <i>et al.</i> (2020)
	<i>Organosolv</i>	Reações de solvólise na lignina e na fração hemicelulose,	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação.	Liberação de compostos inibitórios	ALVIRA <i>et al.</i> (2010) WU <i>et al.</i> (2014)	
	Ozonólise	Reações de ozonólise na lignina e na fração hemicelulose,	Efetiva deslignificação em temperatura ambiente e pressão normal.	Alto custo pelo uso de Ozônio e não leva a formação de inibidores	ALVIRA <i>et al.</i> (2010) ZHANG <i>et al.</i> (2013)	
Físico-químico	Exploração a vapor	Ruptura das ligações intermoleculares	Processo mais econômico, com menor necessidade de energia e ausência de reciclagem.	Liberação de compostos inibitórios	HENDRIKS; ZEEMAN (2009) RABEMANOLONTSOA <i>et al.</i> (2016).	
	AFEX	Clivagem do éter e éster no complexo de lignina através da explosão utilizando nitrogênio	Menor perda de xilanas, baixa formação de inibidores.	Recuperação de amônia não é efetiva para alta concentração de lignina	BJERRE <i>et al.</i> (1996) KLINKE <i>et al.</i> (2002)	
Biológicos	Uso de micro-organismo	Produção de enzimas	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação.	Perda da celulose, baixa taxa de hidrólise.	WAN; LI (2012) RABEMANOLONTSOA <i>et al.</i> (2016).	

Fonte: SANTOS *et al.* (2012) (adaptado)

### 3.3.2 Pré-tratamento por via química

O pré-tratamento químico aplica substâncias ácidas ou básicas capazes de promover hidrólise nas moléculas presente na estrutura química dos polissacarídeos da biomassa lignocelulósica (SADHUKHAN *et al.*, 2019). O pré-tratamento ácido, geralmente, é a principal metodologia utilizada no processo de produção do etanol, por promover a reação de hidrólise

na estrutura da hemicelulose, com elevada eficiência no processo de separação dos açúcares, bem como custo relativamente baixo (OGEDA; PETRI, 2010; YOO *et al.*, 2020). Neste sentido, os ácidos garante ao final do tratamento um sobrenadante rico em monossacarídeos, conhecida como fração hemicelulósica (GONZALES *et al.*, 2016). De acordo com Sun; Chend (2005), são utilizados catalisadores ácidos diluídos, tais como os ácidos nítrico, clorídrico, fosfórico e o sulfúrico para a desestruturação das fibras vegetais. Ácidos com concentrações elevadas também podem ser utilizados para a desestruturação da biomassa lignocelulósica, contudo necessitam ser recuperados ao final da reação de hidrólise, para que o processo se torne economicamente viável (SIVERS; ZACCHI, 1995, ARORA *et al.*, 2020).

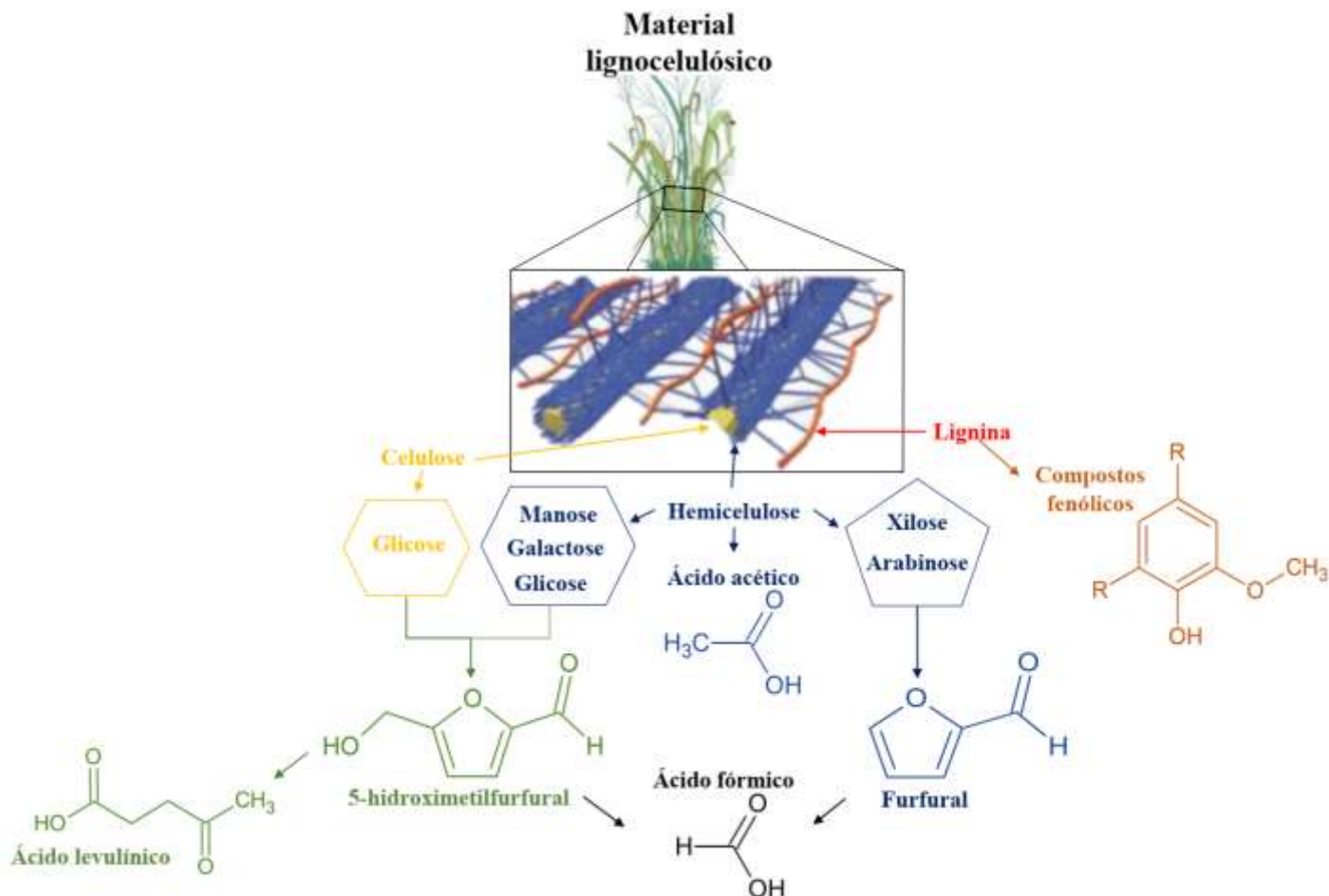
De forma geral, a hidrólise ácida é realizada utilizando-se ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou clorídrico (HCl) em concentração entre 1 e 5%, temperatura por volta de 150°C e pressão de até 10 atm. Sadhukhan *et al.* (2019) reportam que o rendimento de bioetanol usando esse tipo de pré-tratamento, seguido de hidrólise enzimática é cerca de 76%, sendo menor em comparação com a matéria-prima a base de açúcar ou amido e, devido a isso, o pré-tratamento se mostra uma grande barreira para a comercialização do bioetanol lignocelulósico. A comercialização do bioetanol lignocelulósico também pode ser comprometida pela etapa de pré-tratamento por ser capaz de produzir vários compostos inibidores celulares, os quais, podem exercer efeito negativo na etapa de fermentação da produção do bioetanol lignocelulósico (JÖNSSON *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2019).

### **3.3.3 Compostos inibidores formados na etapa de pré-tratamento**

O principal obstáculo para o uso da matéria-prima lignocelulósica na conversão a etanol reside na natureza complexa e recalcitrante da parede celular das plantas, o que torna desafiador desconstruir e extrair os açúcares fermentescíveis (WANG *et al.*, 2019; VANMARCKE *et al.*, 2021). Durante a desconstrução dos polissacarídeos são formados compostos inibidores celulares, independentemente da técnica empregada, capazes de exercer efeito citotóxico ao agente fermentativo utilizado na produção do bioetanol lignocelulósico (MOOD *et al.*, 2013; JONSSON; MARTIN, 2016; LIN *et al.*, 2020).

De acordo com Mussatto; Roberto (2004) os inibidores formados apresentam um efeito sinérgico entre si, atuando sob o agente fermentativo do processo, o que resulta na inibição da conversão dos açúcares presentes no hidrolisado a etanol. Singh *et al.* (2018) relatam que aproximadamente 60 compostos químicos são formados e foram identificados como inibidores da fermentação no hidrolisado lignocelulósicos. Os compostos inibidores celulares

são organizados em torno de três grupos principais, sendo estes, os derivados furanos, os ácidos alifáticos e os compostos fenólicos, que estão representados na Figura 4 (LI *et al.*, 2019; CANDIDO *et al.*, 2020). De acordo com Singh *et al.* (2019), as concentrações desses compostos dependem da matéria-prima lignocelulósica empregada e do processo de hidrólise realizado.



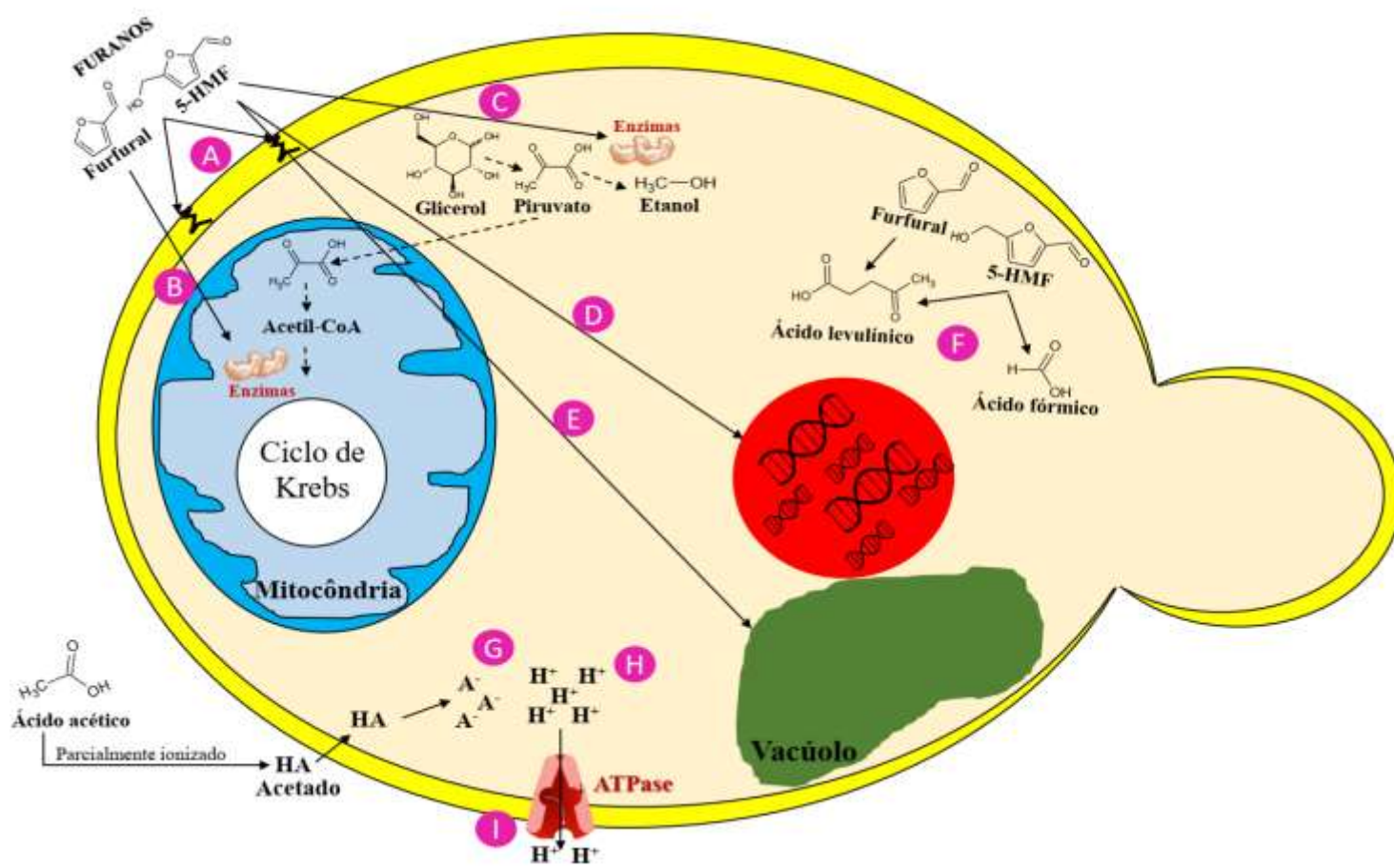
Fonte: MATOS, 2017 (adaptado)

**Figura 4:** Esquema geral dos principais inibidores gerados a partir do material lignocelulósico durante o pré-tratamento ácido.

Os derivados furanos são compostos provenientes da hidrólise dos açúcares liberados no pré-tratamento, tais como: o furfural, proveniente dos monômeros da hemicelulose, predominantemente a xilose e 5-hidroximetil-furfural (HMF) derivado das hexoses, constituído de glicose (HARMSSEN *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2020; VANMARCKE *et al.*, 2021). De acordo com Meier (2020), vários mecanismos têm sido propostos para essa reação, no entanto permanecem controversas, uma vez que a instabilidade dos intermediários permitir seguir as rotas acíclicas ou cíclicas.

O HMF é considerado um composto com menor toxicidade que o furfural e está presente em menor concentração nos hidrolisados hemicelulósicos do que nos hidrolisados

celulósicos (SUN *et al.*, 2019). Os efeitos negativos que os furanos causam às células microbianas estão relacionados à inibição do crescimento e da produção de etanol, conforme exemplificados na Figura 5. De acordo com Van Der Pol (2014), os furanos podem diminuir o crescimento e a produtividade da célula, por afetar a via metabólica pela inibição de enzimas desidrogenases, bem como, em alguns casos, alterar a ação das enzimas piruvato, álcool e aldeído desidrogenase. Os compostos furanos quando presentes no meio reacional podem atuar reduzindo a multiplicação celular, levando a longas fases de latência, afetando a produtividade dos processos microbiológicos (SANCHEZ; BAUTISTA, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2009).



Fonte: MATOS, 2017 (adaptado)

(A) Lise da membrana celular; (B) Modificação na enzima piruvato desidrogenase; (C) Modificação nas enzimas piruvato e álcool desidrogenase; (D) Degradação da molécula de DNA; (E) Danos à membrana do vacúolo; (F) A conversão em outros compostos reduzem o ATP intracelular; (G) Acúmulo de íons aumenta a pressão de turgência ocasionando a ruptura celular; (H) Aumento de H<sup>+</sup> o que diminui pH intracelular afetando o metabolismo celular; (I) Exportação de H<sup>+</sup> pela ATPase, a fim de controlar o pH intracelular e redução de ATP intracelular comprometendo o crescimento celular e vias dependentes de ATP.

Figura 5: Esquema dos principais efeitos dos inibidores na célula.

Inibidores ácidos alifáticos, como o ácido acético, fórmico e levulínico são derivados de grupos acetil presentes na hemicelulose ou ainda, decorrente da decomposição do furfural e

HMF (ALMEIDA *et al.*, 2009). A formação de ácido acético não pode ser evitada, entretanto, processos conduzidos com pH em torno de 5 ou 6 minimiza seus efeitos inibitórios (CASEY *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2011). Esses ácidos orgânicos, quando não dissociados, podem se difundir através da membrana citoplasmática das células microbianas diminuindo o pH intracelular, como demonstrado na Figura 5 (CARMELO *et al.*, 1997; LOHMEIER-VOGER *et al.*, 1998). Desta forma, a célula bombeia o excesso de H<sup>+</sup> para o meio extracelular por ação da adenosinotribose 3-fosfatase (ATPase) as custas de ATP, o qual seria empregado no crescimento e em outras atividades celulares. (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989; PINTO *et al.*, 1989). O meio acidificado ocasiona assim a redução de ATP disponível, pois essa molécula é usada como fonte de energia pela ATPase para realizar o transporte de prótons para o meio extracelular, com o intuito de regular o pH dentro da célula (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 2000; OLIVA *et al.*, 2006). Esse acúmulo de íons no citoplasma também pode aumentar a pressão de turgência, e acarretar em um/no aumento de volume da célula pela entrada de água, levando à ruptura da membrana celular.

### **3.4 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico**

Ao longo dos anos, os pesquisadores vêm estudando algumas estratégias capazes de minimizar os efeitos inibitórios das substâncias formadas na etapa de pré-tratamento, afim de aumentar o rendimento em etanol, tal como a destoxificação (ROQUE *et al.*, 2019). A destoxificação é uma das primeiras estratégias descrita na literatura datando dos anos 40 (PERLMAN *et al.*, 1944; LEONARD *et al.*, 1945) e apresenta como principal objetivo eliminar ou diminuir as substâncias citotóxicas proveniente da etapa de pré-tratamento, bem como promover a remoção dos inibidores do processo fermentativo através do uso de diversos métodos, tais como os biológicos, físicos ou químicos, podendo ser empregados de forma individual ou combinados entre si (KUNDU *et al.*, 2015; CANDIDO *et al.*, 2020).

A destoxificação biológica envolve o uso de enzimas ou micro-organismos capazes de modificar as estruturas dos compostos citotóxicos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos (MUSSATTO; ROBERTO; 2004; SINGH *et al.*, 2019), enquanto os processos químicos se resumem em alteração de pH e adição de compostos redutores (LEE *et al.*, 2014; BRITO *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2020). Os procedimentos físicos são realizados por meio da remoção dos compostos, sem que ocorram mudanças nas estruturas químicas dessas substâncias, através da adsorção promovida por forças de interações entre as superfícies dos adsorventes e as moléculas adsorvidas (KLASSON *et al.*, 2013; CANDIDO *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2020).

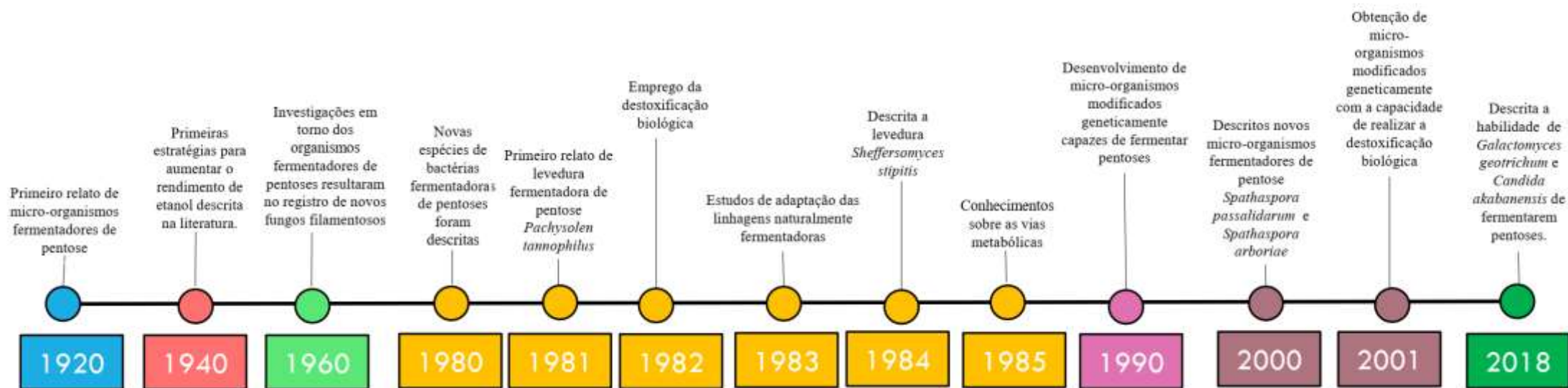
Dentre os principais métodos, o carvão ativado e hidróxido de cálcio (*overliming*) têm sido referência nos processos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico (MATEO *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2018). Rocha *et al.* (2006) definem que a presença significativa de grupos funcionais presentes nos poros do carvão ativado são os responsáveis pela alta adsorção dos inibidores celulares nesse adsorvente.

A destoxificação por meio da combinação das técnicas pode também ser empregada na remoção dos compostos inibidores celulares (CANDIDO *et al.*, 2020). De acordo com Nasidi *et al.* (2015), as técnicas de *overliming* e carvão ativado foram capazes de remover os inibidores citotóxicos, bem como de aumentar a produtividade de álcool em 25% quando comparado ao uso do hidrolisado não destoxificado.

### **3.5 Micro-organismos fermentadores de pentoses**

Um dos desafios na obtenção de resultados mais eficientes na produção de bioetanol de segunda geração é o emprego de micro-organismos capazes de fermentar todos os açúcares livres (pentoses e hexoses) disponíveis nos hidrolisados. Ao longo dos anos, vários estudos abordaram sobre diferentes micro-organismos capazes de converter pentoses a etanol, tais como bactérias, fungos filamentos e leveduras (WIEGEL *et al.*, 1979; SCHERNEIDER *et al.*;1981; MCMILLA *et al.*, 1993; CADETE *et al.*, 2009; KURTZMAN *et al.*, 2015, MATOS *et al.*, 2017 VALINHAS *et al.*, 2018, LI *et al.*, 2019). A história dos fermentadores de pentose está representada na Figura 6, incluindo a descoberta dos micro-organismos capazes de converter as pentoses a etanol e ainda, as estratégias utilizadas para minimizar os efeitos dos inibidores e consequentemente aumento do rendimento do etanol lignocelulósico.





Fonte: Autor

Figura 6: Evolução dos estudos sobre fermentadores de pentoses.

### 3.5.1 Metabolismo

A transformação bioquímica de carboidratos a etanol e CO<sub>2</sub> é constituída de uma série de reações ordenadas, na qual cada etapa é catalisada por enzimas específicas (BETTIGA *et al.*, 2009). Essa cascata de reações ocorre no citoplasma celular, onde os subprodutos finais são sintetizados e expelido para o exterior da célula (DEMEKE *et al.*, 2013)

A transformação bioquímica das pentoses realizadas por micro-organismos, ocorre inicialmente pelo transporte dessas moléculas para o interior do citoplasma (VERAS *et al.*, 2019). Esse transporte ocorre por dois diferentes sistemas: a) difusão facilitada que, com auxílio de proteínas impulsionadas pelo gradiente de soluto conseguem ultrapassar a barreira da membrana plasmática, sendo ainda, compartilhado pelas moléculas de glicose e hidrogênio (KILIAN; UDEN, 1988; FONSECA *et al.*, 2007); b) simporte de prótons de alta afinidade (co-transporte H<sup>+</sup>/açúcar) (SPENCER-MARTINS, 1994; STAMBUK *et al.*, 2003; HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2007), no qual o açúcar juntamente com os prótons atravessam a membrana plasmática, na mesma direção (simporte) ou em direção contrária (antiporte) (LAGUNAS, 1993; BALDWIN, 2000).

A xilose, uma vez dentro das células, sofre reações metabólicas consecutivas, iniciando pela redução da xilose em xilulose e ocorre de duas maneiras dependendo do micro-organismo utilizado, a via oxido-redutiva de assimilação de pentoses e a via da isomerase (WOHLBACHET *et al.*, 2011).

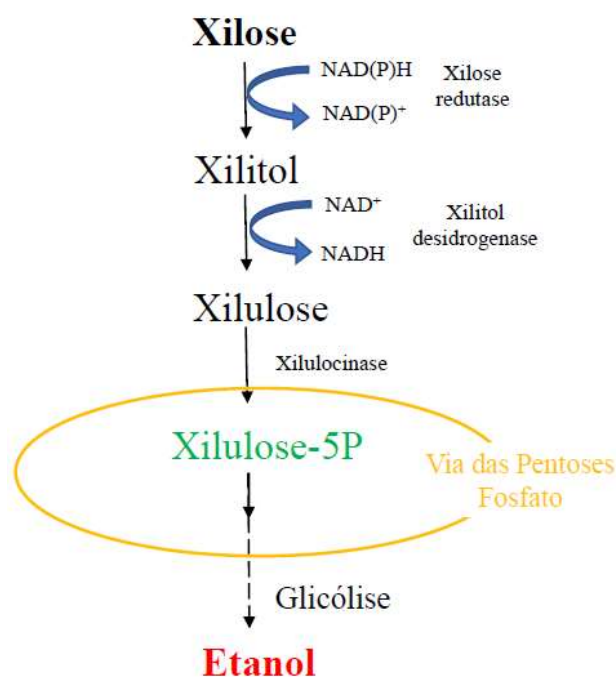
Na via oxido-redutiva feita por fungos filamentosos e leveduras, representada na Figura 7, são envolvidas a enzima xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) para a conversão de xilose a xilulose. A enzima xilose redutase NADPH/NADH-dependente cataliza a reação de redução do grupo carbonil da xilose em xilitol, sendo assim, o xilitol é oxidado pela enzima xilitol desidrogenase NAD<sup>+</sup>-dependente em xilulose (RIZZI *et al.*, 1988; JEFFRIES, 2006; WATANABE *et al.*, 2007; MOYSÉS *et al.*, 2016).

Na via da isomerase realizado por bactérias e alguns fungos, ocorre a isomerização da xilose diretamente para xilulose, sem necessitar de cofatores redox, ocorrendo assim a conversão da xilose em xilulose em apenas uma etapa reacional (KARHUMAA *et al.*, 2007; BRAT *et al.*, 2009; DEMEKE *et al.*, 2013), pela ação da enzima xilose isomerase.

O sistema de metabolização da L-arabinose em xilulose-5-fosfato ocorre de forma semelhante à via de metabolização da xilose, ou seja, de duas maneiras, podendo seguir a via oxido-redutiva ou a via da isomerase (BETTIGA *et al.*, 2009; YE *et al.*, 2019). A via oxido-redutiva é utilizada principalmente por fungos e a via da isomerase, por bactérias.

A via oxido-redutiva, na maioria dos fungos, converte naturalmente L-arabinose em L-arabitol através da reação de redução catalisada pela enzima aldose redutase que é dependente do cofator NADPH. Em seguida ocorre a oxidação do L-arabitol em L-xilulose por ação da enzima L-arabitol-4-desidrogenase, dependente de  $\text{NAD}^+$ . A L-xilulose é então, convertida pela enzima xilose redutase em xilitol, o qual é oxidado a D-xilulose por ação da enzima xilitol desidrogenase (YE *et al.*, 2019). Essas conversões são estritamente dependentes de cofatores. A D-xilulose é fosforilada por ação da enzima xiluloquinase a xilulose-5-fosfato dando início a via da pentose fosfato (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2007).

Independente da via utilizada, na reação seguinte, a xilulose formada é fosforilada pela enzima xiluloquinase, com consumo de ATP, a xilulose-5-fosfato, dando entrada a rota metabólica conhecida por via das pentoses fosfato (WEBB; LEE, 1990). Os metabólitos originados ao final da via das pentoses fosfato, como gliceraldeído-3P e frutose-6P, são inseridos na glicólise ou via EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) e convertidos a piruvato (MATSUSHIKA *et al.*, 2009). O piruvato formado, de acordo com disponibilidade de oxigênio, pode ser metabolizado na cadeia respiratória (fosforilação oxidativa) através do Ciclo de Krebs, ou por ação da enzima piruvato descarboxilase formar acetaldeído, o qual é então, reduzido a etanol por ação da enzima álcool desidrogenase, havendo a reoxidação de NADH (CHU, LEE, 2007). Na Figura 7 encontra-se a rota de metabolização pentoses em leveduras.



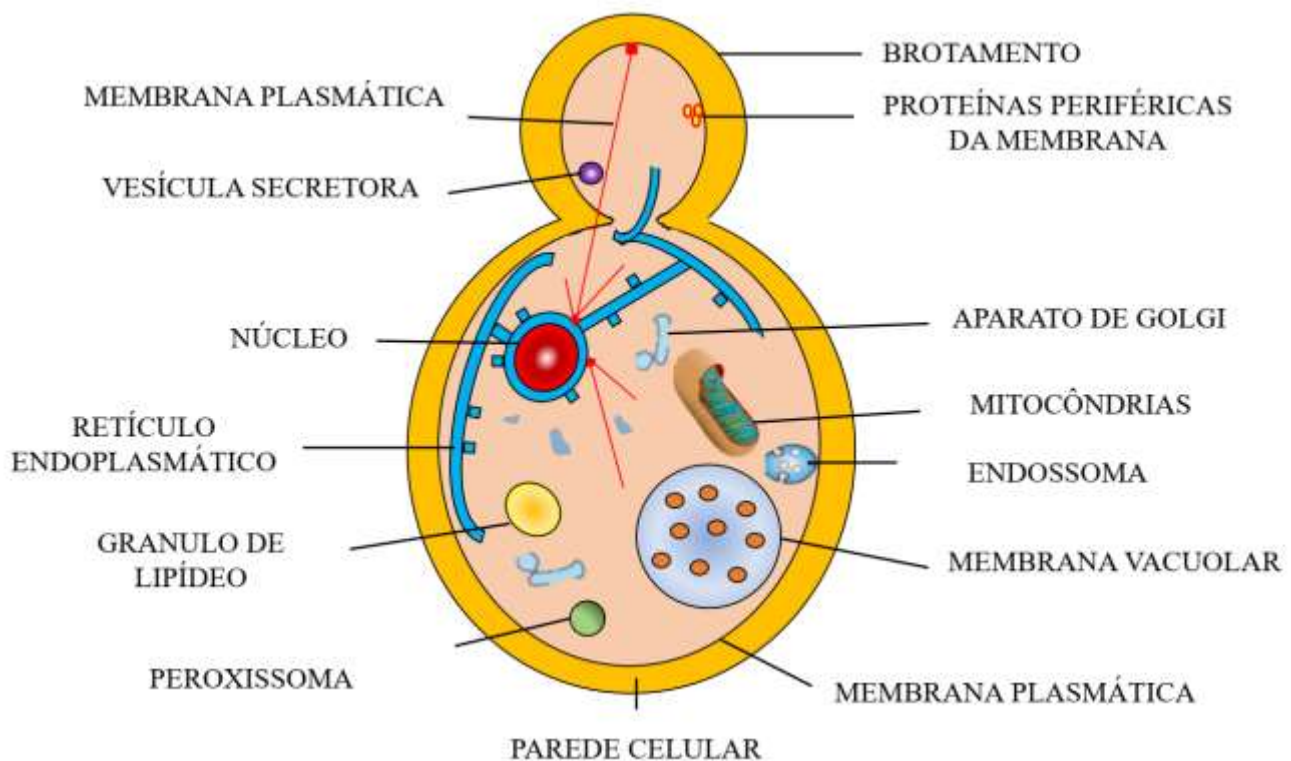
Fonte: VERAS, 2019 (adaptada).

**Figura 7:** Esquema representativo das vias metabólicas envolvidas na conversão de xilose a formação do etanol.

### 3.5.2 Leveduras fermentadoras de pentoses

#### 3.5.2.1 Leveduras

As leveduras são micro-organismos unicelulares heterotróficos pertencentes ao domínio *Eukarya*, reino *Fungi*, que apresentam parede celular rígida e núcleo organizado com membrana nuclear (KURTZMAN, 1994; KURTZMAN *et al.*, 2011). A parede celular de levedura contém três grupos principais de polissacarídeos, como os polímeros de manose (manoproteína, cerca de 40% da massa seca da célula), polímeros de glicose ( $\beta$ -glucano 60% da massa seca da célula) e polímeros de N-acetilglucosamina (quitina, cerca de 2% da massa seca da célula) (AGUILAR-USCANGA; FRANÇOIS, 2003) que são responsáveis pela proteção física das estruturas internas das células (OSUMI, 1998; PÁDUA *et al.*, 2000; FUKUDA *et al.*, 2009). O citoplasma é composto por uma fração fluida onde se encontra as organelas, enzimas, carboidratos de reserva e ribossomos, sendo local onde ocorre a hidrólise de açúcares, tais como, frutose e glicose (JAHANGEER *et al.*, 2019). O vacúolo é uma estrutura importante na célula, pois é utilizado para armazenar diversas enzimas, bem como aminoácidos necessários para a síntese proteica no metabolismo (LICHKO *et al.*, 1982; JAHANGEER *et al.*, 2019) e também participa do mecanismo de desintoxicação das células eucarióticas (WYSOCKI, TAMAS, 2010). Essas estruturas estão representadas na Figura 8.



Fonte: KARL, 2017 (adaptada)

Figura 8: Representação esquemática da célula de levedura.

As leveduras são encontradas em vários ambientes (BLACKWELL *et al.*, 2007; SATYANARAYANA; KUNZE, 2009; COMPAGNO; DASHKO; PIŠKUR, 2014) e de acordo com Rosa; Péter (2006) o tipo de nutriente presente por habitat pode determinar a diversidade de espécies em diferentes nichos. Os nutrientes são exigidos pelos micro-organismos em diferentes quantidades e, dependendo da sua exigência são denominados de macro ou micronutrientes (ALEMAN-RAMIREZ *et al.*, 2019; FITZGERALD *et al.*, 2019). Os macronutrientes são aqueles requeridos em maiores quantidades pelos organismos e, são componentes essenciais de macromoléculas tais como, carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo e enxofre. Em contrapartida, os micronutrientes são aqueles necessários em menores quantidades, como por exemplo, magnésio, cobre, zinco, manganês, selênio, níquel e molibdênio (DOMBEK; INGRAM, 1986; ARIGONY *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2019).

A concentração de micro ou macronutriente no meio de cultivo deve ser levada em consideração, pois em baixas concentrações podem limitar o crescimento celular, e em altas concentrações podem provocar um efeito inibitório sobre as células microbianas (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

Dentre os macronutrientes o carbono e nitrogênio correspondem a 57 e 15% do peso seco da biomassa celular, respectivamente (MCMILLAN, 1994; SATYANARAYANA; KUNZE, 2009; COMPAGNO *et al.*, 2014; ZHANG; ELSER, 2017) e são considerados essenciais, pois dentre os vários fatores ocasionados pela sua ausência, tem-se a restrição da síntese do material celular (EGLI, 1991). O carbono é responsável pelo fornecimento de energia às células e atuam como blocos de construção para a biossíntese de todas as macromoléculas, sendo assim, indispensável para os organismos (GÖRKE; VOGEL, 2008). Esse nutriente é proveniente de vários açúcares, tais como glicose, galactose, maltose, xilose, arabinose, celobiose, lactose (NGUYEN *et al.*, 2019). Em se tratando das pentoses há relatos de vários estudos em torno do seu uso como fonte de carbono.

A relação C:N (carbono:nitrogênio) se constitui em um dos fatores importantes no equilíbrio da biomassa para o crescimento microbiano, pois tanto o excesso quanto a falta de nitrogênio são fatores limitantes para o desenvolvimento do micro-organismo, além de afetar o seu perfil enzimático (BENTIL, 2019). O nitrogênio é um componente básico na formação de aminoácido, e um importante nutriente na sustentação do crescimento microbiano (PICK; LEAN; 1987; MCMILLAN, 1994; SU *et al.*, 2020). De acordo com Carmouze (1994), a célula microbiana assimila com maior facilidade o nitrogênio na forma amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ), enquanto

as demais fontes de nitrogênio necessitam ser transformadas em íons amônio no interior da célula para serem assimiladas.

### **3.5.2.2 Caracterização microscópico e macroscópio das leveduras**

Os aspectos microscópios e macroscópicos das colônias são importantes ferramentas para uma efetiva classificação morfológica (KURTZMAN *et al.*, 2011). Microscopicamente, as leveduras podem apresentar formas variadas, tais como esféricas, ovais, elípticas, apiculadas e triangulares. As formas reprodutivas, sexuada ou assexuada, a qual, esta última, ocorre por gemulação ou por fissão binária, também são ferramentas para classificação das leveduras (FUENTEFRÍA, 2007; DIAS, SCHWAN, 2010; KURTZMAN *et al.*, 2011; SOARES, 2015). A gemulação consiste no surgimento de uma célula adjacente à estrutura do micro-organismo, produzindo outro organismo de forma independente ao originado, enquanto a fissão binária baseia-se em um processo em que a célula se divide em duas, por mitose, e gera duas células geneticamente idênticas (ALEIXO, 1996; JAHANGEE *et al.*, 2019). Algumas espécies apresentam dimorfismo sexual e podem produzir pseudo-hifa e hifas verdadeiras durante seu crescimento (DIAS, SCHWAN, 2010). Nos aspectos microscópicos também se observa presença de filamentos, bem como o tipo e a morfologia dos esporos, como a formação de ascósporo (ascomicetos) e basidiósporos (basidiomicetos, que classifica de modo generalizado em Ascomycota e Basidiomycota, respectivamente (KURTZMAN *et al.*, 2011; ASSUNÇÃO, 2015).

Os aspectos macroscópicos são observados os aspectos da colônia quanto coloração, textura, tamanho, elevação, tipo de borda (lisa, irregular, ondulada), brilho, forma e perfil (lisa, rugosa, côncava, convexa, achatada) (SCHWAN *et al.*, 2008). As análises macro e microscópica de colônias de leveduras compõem etapas necessárias no processo de identificação, possibilitando classificá-las em morfotipos (GUIMARÃES, 2016). Os dados obtidos por essas observações devem ser comparados com dados já catalogados. As subdivisões e algumas classes e até gêneros podem ser diferenciados com base na morfologia celular, na qual se podem verificar variações quanto ao tipo de reprodução, local de geração da célula filha, forma celular entre outros (DIAS; SCHWAN, 2010). Todavia, os testes bioquímicos e fisiológicos, tais como fermentação de carboidratos, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e crescimento em variadas temperaturas, são necessários para uma melhor caracterização destes micro-organismos (PITTY; HOCKING, 2009; KURTZMAN *et al.*, 2011).

As análises supracitadas são complementadas com os testes moleculares a fim de conferir maior segurança e agilidade aos processos de identificação, principalmente para as linhagens, cuja diferenciação não é possível por meio das características morfológicas essenciais (ROSA, PÉTER, 2006; PITY; HOCKING, 2009; KURTZMAN *et al.*, 2015, GUIMARÃES, 2016).

### **3.5.2.3 Leveduras conhecidas como fermentadoras de pentose**

As leveduras têm beneficiado a humanidade há milênios, e apresentam papel fundamental na indústria (BERNARDI; WENDLAND, 2020). Neste sentido algumas linhagens desempenham papel relevante nos processos biotecnológicos, principalmente nos setores de produção de bebidas, alimentos, fármacos, dentre outros (SOUZA, 2011, KURTZMAN, FELL, BOEKHOUT, 2011; ELIODÓRIO *et al.*, 2020). Algumas espécies têm papel chave na produção de biocombustíveis, dentre elas, a na indústria do bioetanol de primeira geração, tal como a linhagem *Saccharomyces cerevisiae*, que é uma levedura comumente empregada nos processos de fermentação para produção de bioetanol utilizando hexoses (KOMESU *et al.*, 2020). De acordo com Santos *et al.* (2017), essa levedura apresenta em seu genoma genes necessários para a metabolização da xilose, todavia, a expressão dessas enzimas é extremamente baixa, não suportando o crescimento em pentoses. Nesse sentido, nos últimos anos, vem se estudando melhorias genéticas para aumentar o desempenho dessa levedura em processos de fermentação utilizando a fração hemicelulósica. Contudo, os estudos ainda não desenvolveram um micro-organismo com características ideais para o processo de conversão da pentose a bioetanol, em altos rendimentos (CORTIVO, 2017; TABAÑAG *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, dentre as leveduras nativas estudadas, a *Sheffersomyces stipitis* tem sido mencionada como uma das linhagens que apresenta a maior habilidade de fermentar xilose a etanol com altas taxas de rendimento (RUCHALA *et al.*, 2020). Essa levedura, além de utilizar a xilose, tem a capacidade de usar todos os principais açúcares provenientes do material lignocelulósico (ÖZCAN *et al.*, 1991; PHAM *et al.*, 2020). Todavia, apresenta baixa tolerância ao etanol e não é capaz de crescer em condições de anaerobiose, fato que se compõe como um dos gargalos da cadeia de produção do etanol lignocelulósico (RUCHALA *et al.*, 2020).

Santos *et al.* (2017) reporta que na tentativa se obter um micro-organismo capaz de atender a todas as características ideais para a bioconversão dos açúcares em etanol, foi realizada a introdução de fragmentos genômicos de *Scheffersomyces stipitis* na espécie de

levedura *Saccharomyces cerevisiae*, no qual altas taxas de crescimento foram alcançadas, contudo o produto principal formado foi o xilitol, obtendo baixos rendimentos de etanol.

Cadete *et al.* (2012) em seus estudos, demonstraram que uma nova espécie *Spathaspora passalidarum* capaz de converter xilose a etanol em altos rendimentos, e devido a isso é considerada promissora ao mercado industrial de energia. Esses pesquisadores observaram que a levedura, em condições de microaerobiose foi capaz de converter a pentose em etanol, em rendimentos de cerca de  $0,37 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{xilose}}^{-1}$ .

Nos estudos de Cadete *et al.* (2009), *S. arboriae* também demonstrou a capacidade de fermentar as pentoses presente nos hidrolisados lignocelulósicos de casca de arroz e de casca de soja, exibindo rendimentos de etanol de 0,45 e 0,38  $\text{g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{xilose}}^{-1}$ , respectivamente. Essa levedura ainda apresenta a capacidade de sintetizar o xilitol, resultando em maiores rendimentos de conversão do *S. passalidarum* (DA CUNHA-PEREIRA *et al.*, 2011; CADETE; ROSA, 2018).

No estudo de Valinhas *et al.* (2018) foram descritas linhagens de leveduras, a das espécies *Candida akabanensis* e *Galactomyces geotrichum* com habilidade de fermentar pentoses, característica que não haveria sido relatada até então. Os autores observaram que as leveduras *Candida akabanensis* e *Galactomyces geotrichum* em meio sintético contendo xilose, eram capazes de converter  $20 \text{ g L}^{-1}$  a pentose em etanol, obtendo um rendimento de 0,29 e 0,35  $\text{g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{xilose}}^{-1}$ , respectivamente. Nesse mesmo período, Matos *et al.* (2017) testaram essas leveduras em hidrolisado da torta de semente de girassol, no qual, em 96 horas de fermentação as linhagens foram capazes de converter os açúcares presentes no hidrolisado lignocelulósico em etanol, apresentando rendimentos de cerca de  $0,29 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{xilose}}^{-1}$ .

Dien *et al.* (1996) realizaram um estudo de rastreamento em 116 diferentes linhagens de leveduras, avaliando a capacidade dessas em assimilar pentoses, como arabinose e xilose. Esses autores foram capazes de encontrar quatro linhagens de leveduras das espécies (*Candida aurangiensis*, *Candida succiphila*, *Ambrosiozyma monospora* e outra do gênero *Candida*) com habilidade de fermentar as pentoses a etanol, obtendo um rendimento máximo de  $0,18 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{xilose}}^{-1}$ .

Cobalto *et al.* (2018) observaram que uma linhagem de levedura da espécie *Dekkera bruxellensis*, utilizando  $80 \text{ g L}^{-1}$  de L-arabinose como fonte de carbono, em 120 horas, permitiu um rendimento de  $0,34 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{xilose}}^{-1}$  em etanol. Portanto, nesse estudo foi possível encontrar um micro-organismo promissor na produção de etanol a partir de hidrolisado lignocelulósico.



Neste contexto, um dos principais desafios para o custo-benefício da produção do bioetanol lignocelulósico é a busca por micro-organismos capazes de fermentar eficientemente todos os açúcares disponibilizados pela biomassa lignocelulósica, mesmo em presença de compostos químicos tóxicos (CADETE *et al.*, 2016; NOGUÉ; KARHUMAA, 2015).

#### **3.5.2.4 Leveduras fermentadoras de pentoses utilizadas no presente estudo**

##### *a) Candida orthopsilosis*

De acordo com Ciurea *et al.* (2020), as espécies de *Candida* pode causar uma grande variedade de doenças em humanos, variando de candidíase oral a doenças invasivas disseminadas, contudo, na área industrial essa espécie apresenta pouco conhecimento para seu emprego. De acordo com Kanti, Sudiana (2015), devido habilidade da *Candida orthopsilosis* em converter celulose a lipídios, tais como ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico e ácido oleico, poderiam ser utilizado como matéria-prima para produção de biodiesel. Rasmey *et al.* (2020) relata que essa levedura tem a capacidade de metabolizar os materiais lignocelulósicos em glicerol com rendimentos de 0,3576 g g<sup>-1</sup>. Barbosa (2017) reportou a *C. orthopsilosis* tem a capacidade de produzir etanol lignocelulósico utilizando os açúcares de cinco e seis carbonos. De acordo com esse autor, a espécie *C. orthopsilosis*, macroscopicamente tem aspecto cremoso, coloração creme, superfície e bordas lisas, e perfil achatado, e essa descrição também corrobora com a descrita por Kurtzman *et al.* (2011). Esse autor retrata também que microscopicamente, essa espécie apresenta ascósporo e blastoconídios, com reprodução por brotamento multilateral, conforme descrito por Lachance *et al.* (2011).

##### *b) Candida akabanensis*

De acordo com Valinhas (2017) outra espécie do gênero *Candida* também pode ser utilizada para a conversão de açúcares de cinco carbono em etanol, apresentando poucos relatos sobre o seu emprego na área industrial. Na literatura, Valinhas *et al.* (2018) e Matos *et al.* (2017) foram os primeiros autores a relacionarem essa espécie na produção de etanol lignocelulósico. James *et al.* (2013) relata que as linhagens de *C. akabanensis* vêm sendo isoladas de plantas e excremento de insetos e de acordo com Valinhas (2017) essa espécie apresenta colônias com aspecto cremoso, superfície e bordas lisas, perfil achatado e coloração branco-amarelada. Microscopicamente, esse autor relata a presença de células globosas e ovoides, com a formação de pseudo-hifa e presença de ascósporo e blastoconídios.

### c) *Galactomyces geotrichum*

Segundo Altun *et al.* (2020) *Galactomyces geotrichum* é um fungo dimórfico com processos de transições entre as formas, com as cepas geralmente não patogênicas e comumente encontradas em bebidas alcoólicas e no solo, além de alimentos como leite e queijo. Esses autores relatam que as cepas de *G. geotrichum* podem ser empregadas como cultura inicial na preparação de vários queijos e bebidas, bem como ser usados na biorremediação de produtos químicos tóxicos. Grygier *et al.* (2020) mostraram que *G. geotrichum* tem potencial para produzir lipídios, no entanto, o emprego de resíduos ou subprodutos agrícolas como substrato para a produção de lipídios, ainda não foi testada. De acordo com Valinhas (2017), Barbosa (2018) e Matos *et al.* (2018), essa espécie é capaz de produzir etanol utilizando pentoses presentes em meios sintéticos e hidrolisados lignocelulósicos. Primeira vez retratada por Valinhas *et al.* (2018) como habilidade de metabolizar xilose em etanol, essa capacidade também foi descrita por Lamounier *et al.* (2020), que investigou ainda, a capacidade de sacarificação realizadas pelas suas enzimas. Esses autores relatam que a *G. geotrichum*, apresentaram colônias em forma circular, superfície com estria concêntrica, borda e aspecto filamentosos e crescimento radial. Microscopicamente, esses autores relatam que a levedura apresenta a formação de hifas verdadeiras hialinas com ramificações dicotômicas, que apresentam desarticulação em artroconídeos cilíndricos. Barbosa (2018) observou também a presença de ascósporos, clamidósporos, e tubo germinativo. Todas as características observadas estão de acordo com as observações de Hoog, Smith (2011).

### 3.6 Parâmetros Fermentativos

Os parâmetros cinéticos do processo fermentativo contribuem para o melhor entendimento das respostas da conversão dos açúcares a bioetanol. De acordo com Fukuda *et al.* (2019) esses parâmetros contribuem ainda, para a redução de custos do processo fermentativo. Phisalaphong *et al.* (2006) reportam que os parâmetros do processo são determinados por variações na transferência de massa e no comportamento metabólico dos micro-organismos e são baseados em cálculos matemáticos. Esses autores demonstram ainda, que alguns dos parâmetros do processo, podem ser: a) rendimento em etanol ( $Y_p/s$  g g<sup>-1</sup>); b) produtividade volumétrica de etanol ( $Q_p$  g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), c) eficiência fermentativa,  $E_f$  (%), d) velocidade de crescimento celular (g L<sup>-1</sup>) e, e) tempo de geração (h). Essas variáveis de respostas encontram-se apresentadas no Quadro 2, constando suas fórmulas matemáticas e suas respectivas unidades.

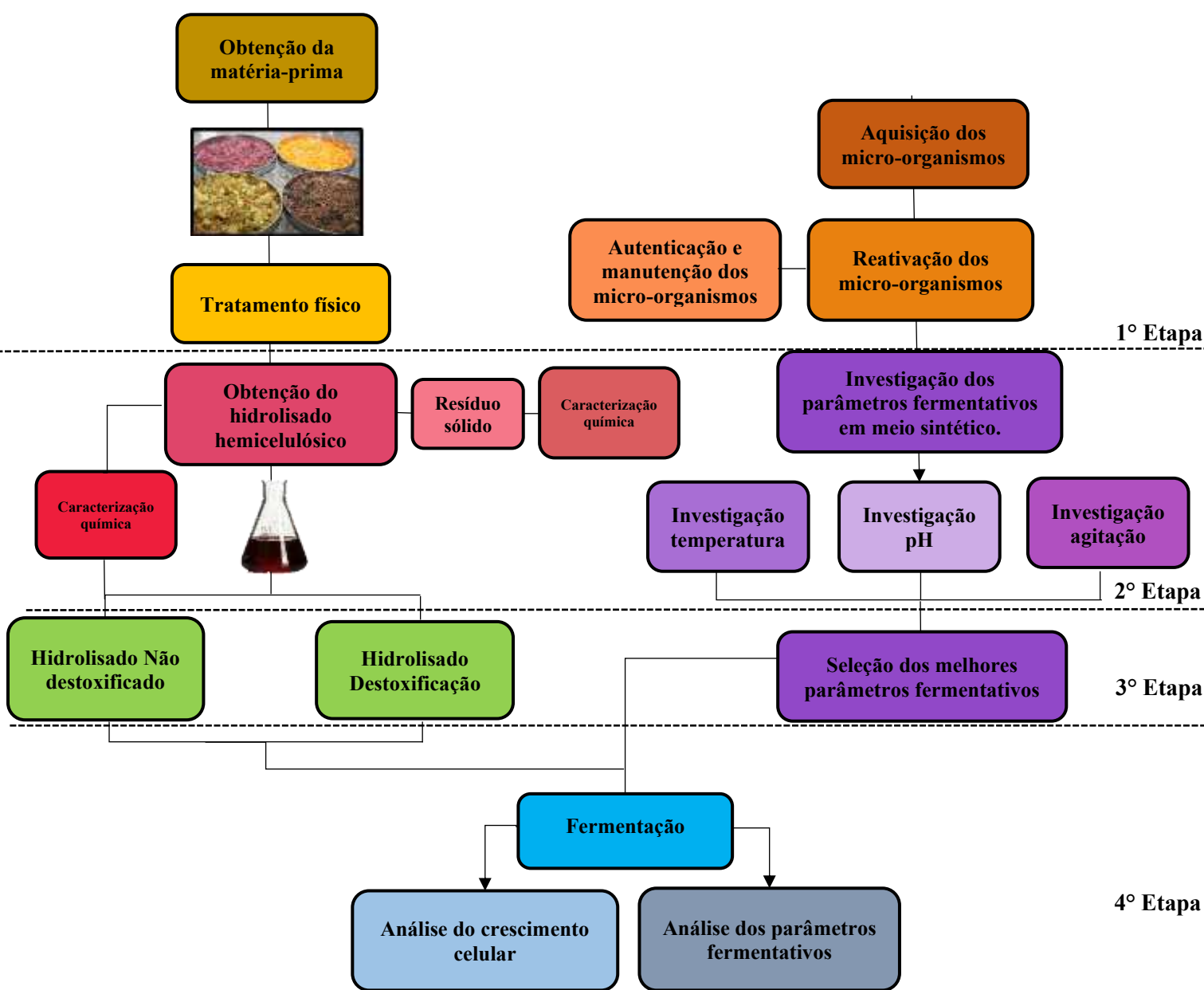
**Quadro 2:** Parâmetros dos processos fermentativos.

PARÂMETROS DO PROCESSO	FÓRMULA	UNIDADE
Rendimento	$y \frac{p}{s} = \frac{P}{S_i - S_f}$	g g <sup>-1</sup>
Produtividade volumétrica	$Q_p = \frac{P}{t}$	g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Eficiência Fermentativa	$E_f = \frac{y \frac{p}{s}}{0,511} \times 100$	%
Taxa de crescimento	$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t$	g L <sup>-1</sup>
Tempo de geração	$t_g = \frac{t}{n}$	H

De acordo com Kuhad *et al.* (2011) um micro-organismo eficiente para a produção de etanol a partir de pentoses presentes em hidrolisados lignocelulósicos, deve apresentar alguns requisitos, tais como: a) elevado rendimento em etanol, b) alta produtividade, c) ter uma boa tolerância contra inibidores, d) gerar altas concentrações de etanol e, e) apresentar uma capacidade de fermentar em pH e temperatura ideais. Desse modo, ao longo dos anos vários estudos abordaram sobre diferentes micro-organismos capazes de converter pentoses a etanol, tais como bactérias, fungos filamentos e leveduras (WIEGEL *et al.*, 1989; SUES *et al.*, 2005).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

A condução desse estudo se encontra organizada em quatro etapas principais, conforme esquematizadas no fluxograma abaixo, a saber: 1) Obtenção e caracterização físico-química da torta de caroço de algodão; bem como obtenção, reativação, manutenção e autenticação dos micro-organismos; 2) Obtenção e caracterização química do hidrolisado hemicelulósico, e ainda uma investigação dos parâmetros fermentativos (Temperatura, Velocidade de agitação e pH), buscando a melhoria na produção de etanol; 3) Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico e 4) Processo fermentativo.



Fonte: AUTOR

Figura 9: Fluxograma da metodologia da produção de etanol utilizando as linhagens fermentadoras de pentoses.

As etapas experimentais foram realizadas nos laboratórios de: a) Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação (LabBbio); b) Laboratório de Pré-tratamento e Caracterização de Biomassas Energéticas (LabPCBE) e c) Laboratório de Microbiologia para Biocombustíveis (LabMBio) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, localizados no Campus JK, Diamantina-MG. As linhagens foram devidamente registradas no SISGEN, sob número de cadastro A18446E.

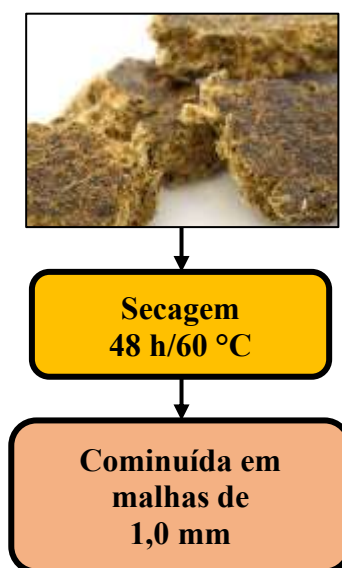
## 4.1 Matéria-prima

### 4.1.1 Obtenção da matéria-prima

A matéria-prima estudada, a torta de caroço de algodão (*Gossypium hirsutum L.*) foi proveniente da indústria de Óleo, Ração e Plásticos Montes Claros LTDA, localizada no município de Montes Claros- MG (SANTOS, 2012)

### 4.1.2 Tratamento físico da biomassa lignocelulósica

A torta de caroço de algodão foi submetida à secagem em estufa com circulação de ar forçada à 60°C por 48 horas, e, em seguida, cominuída em moinho de facas macro tipo Willey com peneiras de retenção em aço inox AISI 304 e malha de 1,0 mm. A biomassa cominuída foi acondicionada em potes plásticos e mantidas a temperatura ambiente (25±2°C) para estudos posteriores, conforme representado na Figura 10.



Fonte: SANTOS (2012)

**Figura 10:** Fluxograma da obtenção e tratamento físico da torta de caroço de algodão.

### 4.1.3 Caracterização química da biomassa lignocelulósica

A origem e o tratamento da torta de caroço de algodão utilizada nesse estudo, foi a mesma usada nos estudos de Santos (2012), que observou na caracterização dessa biomassa teor de hemicelulose de 15,98%, teor de celulose de 8,76%, teor de amido de 45,32% e Açúcares solúveis totais (AST) de 2,39%, conforme representados no Quadro 3.

**Quadro 3:** Composição físico-química da torta do caroço de algodão (*Gossypium sp.*).

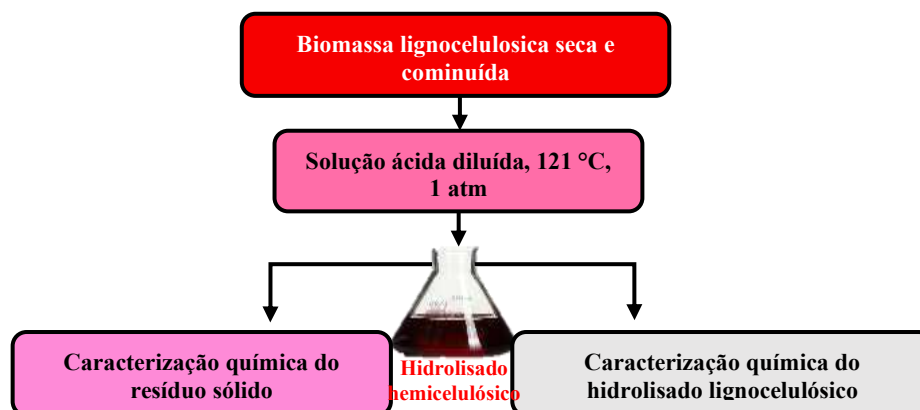
Frações	Matéria-prima lignocelulósica
	Torta de algodão (%)
Umidade	3,27±0,08
Lipídeos	3,38±0,06
Cinzas	3,70±0,13
Fibra Bruta	23,04±0,05
Proteínas Totais	4,44±0,55
AST	2,39±0,35
Amido	45,32±1,80
FDA	52,19±0,14
FDN	33,29±1,13

Fonte: SANTOS (2012)

AST: Açúcares solúveis totais; FDA: Fibra solúvel em detergente ácido; FDN: Fibra solúvel em detergente neutro.

### 4.2 Obtenção do hidrolisado lignocelulósico por hidrólise química ácida

A torta de caroço de algodão previamente seca e cominuída, conforme o item 4.1.2, foi submetida a um pré-tratamento químico, afim de proporcionar a desestruturação das fibras vegetais e produzir um hidrolisado hemicelulósico rico em açúcares para ser utilizado em ensaios fermentativos futuros, segundo representado na Figura 11.



**Figura 11:** Fluxograma da obtenção e caracterização química dos hidrolisados.

Fonte: AUTOR

#### 4.2.1 Preparo do hidrolisado hemicelulósico

A torta de caroço de algodão foi pesada e colocada em um frasco cônico tipo Erlenmeyer de 1 litro com solução de 8 % de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e relação de 31% sólido/líquido, segundo o estudo de Santos (2012). Em seguida, o frasco cônico contendo a amostra foi colocado na autoclave vertical à temperatura de 121°C, 1 atm e no tempo de 38 min. Após o resfriamento do produto formado, esse foi filtrado a vácuo utilizando um papel de filtro (grau 292, 100 x 150 mm Sartorius®). Após o processo de filtração, foi obtido duas frações do produto formado: a fração líquida e a fração sólida. A fração sólida remanescente foi caracterizada quanto ao teor de hemicelulose, lignina e celulose, e, esses teores foram utilizados para realizar o cálculo de balanço de massa, afim de observar a eficiência do pré-tratamento empregado. Após a caracterização química, o resíduo sólido remanescente foi armazenado para futuros estudos. A fração líquida constituiu o hidrolisado lignocelulósico, que inicialmente foi mensurado o pH e adicionado uma solução supersaturada de Ca (OH)<sub>2</sub> P.A, até a sua completa neutralização. O hidrolisado hemicelulósico neutralizado foi armazenado a 4°C para realização dos processos fermentativos posteriores.

#### 4.2.2 Caracterização química do resíduo sólido

O resíduo sólido remanescente do processo de hidrólise química foi lavado sucessivas vezes com água destilada utilizando a filtração a vácuo em papel de filtro (grau 292, 100 x 150 mm Sartorius®). Em seguida o resíduo foi levado para estufa com circulação de ar forçada a 65°C por 24 horas. Após a secagem, foi determinado em triplicatas, os teores de celulose, lignina, hemicelulose (VAN SOEST, 1966; 1967).

##### 4.2.2.1 Hemicelulose

O teor de hemicelulose foi determinado pela diferença entre a massa da amostra resultante das análises de Fibra solúvel em detergente neutro (FDN) e Fibra solúvel em detergente ácido (FDA). O teor foi calculado de acordo com a Equação 1 representada abaixo:

$$HEM = [m(FDA) - m(FDN) \text{ Peso da amostra}] \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

**HEM%**= teor de hemicelulose (%)

**m(FDA)**= massa da amostra remanescente da análise de FDA (g)

$m(\text{FDN})$ = massa da amostra remanescente da análise de FDN (g)

a) **Fibra solúvel em detergente neutro (FDN):** A FDN foi determinada pela digestão de 0,25 g do resíduo sólido, colocados em tubos de ensaios e em seguida foi adicionado 25 mL de solução de detergente neutro. Os tubos de ensaios contendo a amostra foram acondicionados em bloco digestor por 30 minutos a 110°C. O produto remanescente foi filtrado em filtros de placa sinterizada previamente pesados e desumidificados em estufa a 105°C. Após ser filtrado, o resíduo foi lavado com água destilada a quente (65±2°C) e posteriormente, lavado com acetona para retirada total do detergente. Os filtros contendo as amostras foram levados para secagem em estufa a 105°C até peso constante. O teor de fibras solúveis em detergente neutro foi expresso em gramas de FDN por 100 g-1, calculado usando a Equação 2:

$$\text{FDN} = [(F_s - F_v) \text{ Peso da amostra}] \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

FDN= teor de fibra bruta solúvel em detergente neutro (%)

F<sub>s</sub>= massa do filtro de vidro sinterizado com resíduo depois de lavado e seco (g)

F<sub>v</sub>= massa do filtro de vidro sinterizado vazio (g)

b) **Fibra solúvel em detergente ácido (FDA):** A FDA foi determinada utilizando 0,25 g de resíduo sólido colocado em tubos de ensaios juntamente com 25 mL de solução de detergente ácido. Os tubos de ensaios contendo a amostra foram colocados em bloco digestor por 30 minutos a 110°C. Ao final do processo, o produto foi filtrado a vácuo em filtros de placa sinterizada com pesos conhecidos, lavado com água destilada quente (65±2°C) e em seguida lavado com acetona. Após a lavagem, o resíduo foi submetido a secagem em estufa a 105°C até o peso constante. O teor de fibras solúveis em detergente ácido foi expresso em gramas de FDA por 100 g-1 e calculado usando a Equação 3:

$$\text{FDA} = [(F_{lv} - F_v) \text{ Peso da amostra}] \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

FDA= teor de fibra bruta solúvel em detergente ácido (%)

F<sub>lv</sub>= massa do filtro com resíduo depois de lavado e seco (g)

F<sub>v</sub>= massa do filtro vazio (g)



#### 4.2.2.2 Celulose

A determinação do teor de celulose foi realizada pela adição de 30 mL de ácido sulfúrico a 72% em filtros de placa sinterizada remanescentes da análise de FDA, e submetidos à agitação em um agitador magnético a velocidade vigorosa. Em seguida, os filtros contendo a amostra foram lavados com água destilada quente ( $95\pm 1^\circ\text{C}$ ), secos em estufa a  $105^\circ\text{C}$  e resfriados até peso constante. O peso de celulose foi calculado pela diferença entre o peso do filtro antes e depois da adição da solução de ácido sulfúrico a 72%. O resultado encontrado de acordo com a fórmula descrita a Equação 4 e expresso em porcentagem de massa integral.

$$CEL = [(Fi - Fd) \text{ Peso da amostra}] \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

**CEL**= teor de celulose (%)

**Fi**= massa do filtro sinterizado com resíduo depois de lavado e seco, antes da adição do ácido sulfúrico (g)

**Fd**= massa do filtro de vidro sinterizado com resíduo depois da adição do ácido sulfúrico (g)

#### 4.2.2.3 Lignina

O teor de lignina foi determinado utilizando os resíduos remanescentes da análise de celulose presentes nos filtros de placa sinterizada. Esses resíduos contidos nos filtros foram colocados em mufla a  $550^\circ\text{C}$  e em seguida os filtros foram deixados em um dessecador até atingir temperatura ambiente ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ). O teor de lignina foi calculado pela diferença entre a massa do filtro de placa sinterizada antes e após a incineração representado na equação 5.

$$LIG = [(Fi - Fm) \text{ Peso da amostra}] \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

**LIG**= teor de lignina (%)

**Fi**= massa do filtro de vidro sinterizado contendo resíduo lavado e seco depois da adição do ácido sulfúrico (g)

**Fm**= massa do filtro de vidro sinterizado contendo resíduo depois de incinerados em mufla (g)

### 4.2.3 Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico

A fração hemicelulósica foi analisada quanto as concentrações de açúcares (L-arabinose, D-xilose, D-glicose) e teores de inibidores formados durante o processo de hidrólise ácida (ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF)), bem como o glicerol, conforme os padrões representados na Tabela 1. A determinação das concentrações dos compostos presente no hidrolisado foi realizada através da metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com uso do sistema Shimadzu Prominence FPLC 20A, equipado com coluna Rezex ROA-Shodex® (300 x 7.5 mm), conforme as condições operacionais detalhadas na Tabela 2.

**Tabela 1:** Padrões utilizados na quantificação dos compostos químicos

Padrões	Concentrações
D-glicose	10 g L <sup>-1</sup>
D-xilose	10 g L <sup>-1</sup>
L-arabinose	10 g L <sup>-1</sup>
Glicerol	10 g L <sup>-1</sup>
Ácido acético	10 g L <sup>-1</sup>
Furfural	10 g L <sup>-1</sup>
Hidroximetilfurfural	10 g L <sup>-1</sup>

**Tabela 2:** Condições operacionais das análises realizadas por CLAE para determinação de açúcares e inibidores tóxicos provenientes do pré-tratamento químico ácido na torta de caroço de algodão.

Eluente	Ácido sulfúrico H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,0025 mol L <sup>-1</sup>
Vazão de fase móvel	0,6 mL min <sup>-1</sup>
Volume de amostra (loop)	5 µL.
Temperatura externa (coluna)	60°C
Temperatura interna (detector)	40°C

### 4.3 Destoxificação do hidrolisado ácido da torta de caroço de algodão

#### 4.3.1 Procedimento de destoxificação do hidrolisado

O hidrolisado hemicelulósico foi acondicionado em um Becker contendo 5% (m/v) de carvão ativado, e esse foi colocado em um agitador magnético sob agitação vigorosa por 30 minutos à 50°C, em seguida foi filtrado a vácuo, segundo os estudos de Brito *et al.* (2017). O

líquido remanescente foi congelado a temperatura de 4°C para uso posterior nos processos fermentativos.

#### **4.3.2 Caracterização dos compostos presentes no hidrolisado hemicelulósico destoxificado**

O hidrolisado destoxificado foi caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme os padrões e parâmetros operacionais descritos no item 4.2.3.

#### **4.4 Micro-organismos**

Os micro-organismos fermentadores de pentose foram estudados conforme as seguintes etapas: 1) Aquisição dos micro-organismos; 2) Reativação dos micro-organismos; 3) Autenticação dos micro-organismos; 4) Manutenção dos micro-organismos e, 5) Investigação dos melhores parâmetros fermentativos para produção de etanol.

##### **4.4.1 Aquisição, reativação e manutenção dos micro-organismos**

As linhagens de leveduras utilizadas nesse estudo *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, *Candida akabanensis* UFVJM-R131 e *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G foram provenientes do banco de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia para Biocombustíveis (LabMBio), localizado na Universidade dos Vales Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). As amostras disponibilizadas estavam conservadas em microtubos tipo Eppendorf em meio Yeast extract-Peptone-Malt-Dextrose-YEPM (3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte; 5,0 g L<sup>-1</sup> de peptona de soja e 10 g L<sup>-1</sup> de glicose) e 10% de glicerol, por aproximadamente 1 ano. Essas linhagens foram reativadas em meio YEPMX (3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte; 5,0 g L<sup>-1</sup> de peptona de soja e 10 g L<sup>-1</sup> de xilose) acrescido de 1,5% (m/v) de ágar-ágar, por inóculo em estria, com incubação a 28°C por 48 horas, para os posteriores ensaios descritos a seguir. Para a manutenção das linhagens estudadas, essas foram crescidas em meios YEPMX e armazenadas nesse mesmo meio contendo glicerol 10%.

#### **4.4.2 Autenticação dos micro-organismos**

As linhagens leveduriformes utilizadas neste estudo, foram submetidas ao processo de autenticação por análises macroscópicas e microscópicas, garantindo assim, que se encontravam em condições axênicas para uso, bem como verificar a autenticidade dessas linhagens estudadas.

##### **4.4.2.1 Análises macroscópicas**

As linhagens de leveduras, após a reativação, foram transferidas para um microtubo tipo *Eppendorf* com 1 mL de água destilada estéril e deixadas por 48 horas a 28°C. Em seguida as linhagens foram inoculadas, por microgotas (10 µL), em duplicatas nos meios YEPMX e foi acompanhando o crescimento por 7 dias. Alguns parâmetros macroscópicos da colônia foram observados, tais como o tamanho, a cor, o tipo de borda (lisa, irregular, ondulada) e perfil (lisa, rugosa, côncava, convexa, achatada) das culturas.

##### **4.4.2.2 Análises microscópicas**

As análises microscópicas foram realizadas por leitura direta em lâminas, microscópio óptico e, ainda, pela técnica de Riddell (RIDDELL, 1950) utilizando meio YEPMX, com incubação de 28°C por até 48 horas. Na microscopia foram observadas as características estruturais e reprodutivas das leveduras, tais como: tipo de reprodução, formação de pseudohifa e hifa verdadeira, forma da célula e presença de clamidósporo e conídios. As observações foram realizadas em microscópio óptico (microscópio *bioval* e *Bel Photonic*) utilizando as lentes objetivas de 40x e 100x.

#### **4.4.5 Perfil de crescimento dos Micro-organismos**

##### **4.4.5.1 Curva de crescimento**

O perfil de crescimento dos micro-organismos estudados foi monitorado em meio sintético descrito por Oliveira (2010), composto por 12,5 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,25 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 12,5 g L<sup>-1</sup> de ácido cítrico; 0,9 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,19 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>; 0,30 g L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,025 g L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 0,025 g L<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,035 g L<sup>-1</sup> de NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,050 g L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,009 g L<sup>-1</sup> de KI e 0,0125 g L<sup>-1</sup> de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, realizado em triplicata. Em frascos cônicos tipo Erlenmeyer de 125 mL foi realizado um inóculo utilizando uma alçada das culturas de leveduras em 50 mL de meio sintético e incubadas a 28°C

sob velocidade de agitação de 150 rpm por 24 horas. O monitoramento do processo foi realizado por alíquotas de 200 µL a cada 1 hora, seguido de centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. O precipitado celular foi ressuspensão em 1 ml de água destilada estéril e submetido à leitura espectrofotométrica a 610 nm (Densidade Óptica- D.O. 610 nm). Uma alíquota desse precipitado foi utilizada para contagem celular na câmara de Neubauer e uma para a medição do peso seco, conforme descrito a seguir.

- a) **Densidade óptica:** A Densidade ótica foi avaliada por espectrofotometria com leitura de absorvância a 610 nm, feita a partir de 1 mL do meio fermentativo, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o precipitado de células formado foi lavado e ressuspensão em água destilada, sendo submetido à leitura (D.O. 610nm)., enquanto o sobrenadante foi descartado.
- b) **Peso seco:** As culturas foram preparadas em duplicata em frascos cônicos de 125 mL, e incubadas a 28°C sob agitação de 150 rpm por 24 horas. A biomassa celular formada foi centrifugada e ressuspensão em 15 ml de água estéril. A suspensão microbiana foi dividida em frações de 0,5 mL a 5 mL (variando as amostras em 0,5 mL), medida por espectrofotometria com leitura de absorvância a 610 nm e colocado em placas de petri, previamente pesadas. Essas placas foram levadas para estufa á 105°C até peso constante, sendo novamente pesadas. Os valores encontrados na diferença da pesagem da placa de petri antes e depois do acondicionamento da suspensão celular das leveduras, foram utilizados para construção das curvas celulares, posteriormente usadas para cálculos de rendimentos fermentativos.
- c) **Quantificação celular:** A determinação da viabilidade celular das linhagens de leveduras foi realizada pela solução a 1% de azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer, conforme a metodologia de Alves (1998) e descrito na Figura 12. O azul de metileno é empregado como indicativo de viabilidade celular, ou seja, as células vivas se apresentaram incolores e as células não viáveis na coloração azul, quando observadas no microscópio óptico. O resultado da contagem celular foi expresso em número de células mL<sup>-1</sup> de acordo com a Equação 7.

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{nxfd}{0,004} \times 1000$$

Equação (7)

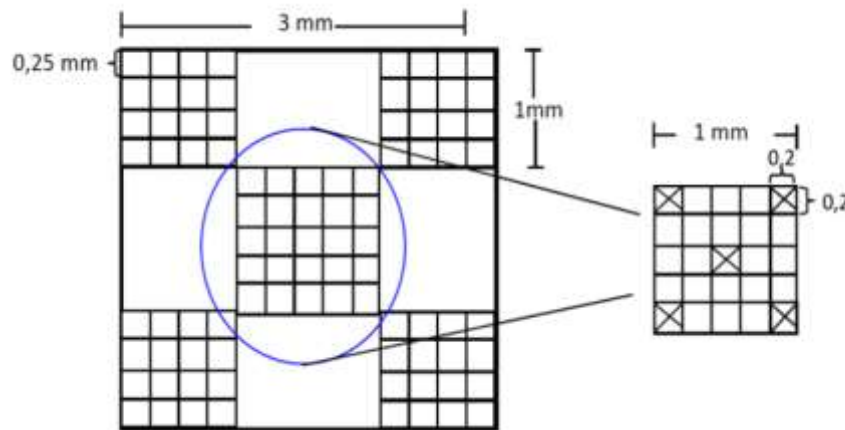
Onde:

n= média de cinco contagens

fd= fator de diluição

1000= fator de conversão de mm<sup>3</sup> para cm<sup>3</sup>

0,004= volume do quadrado onde foi realizada a contagem.



Fonte: PANTOJA (2006)

**Figura 12:** Desenho esquemático da câmara de Neubauer evidenciando a área de contagem.

#### 4.4.6 Investigação dos parâmetros fermentativos

Visando conhecer as melhores condições operacionais para a condução dos processos fermentativos no hidrolisado do caroço de algodão utilizando as linhagens de leveduras *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, *Candida akabanensis* UFVJM-R131, e *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G como agentes do processo, os parâmetros de temperatura, velocidade de agitação e pH foram investigadas.

Os processos foram conduzidos em frascos cônicos tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio Yeast extract-Peptone-Malt-Xylose (YEPMX) (3,0 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura; 3,0 g L<sup>-1</sup> malte; 5,0 g L<sup>-1</sup> caseína de soja; 10,0 g L<sup>-1</sup> D-xilose), seguido de 10% de inóculo descrito abaixo. Os processos foram realizados em três repetições.

##### 4.4.6.1 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado por meio da transferência de uma alçada da linhagem de levedura, a ser estudada, em meio YEPMX para o meio líquido proposto por Oliveira (2010), composto por 12,5 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,25 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 12,5 g L<sup>-1</sup> de ácido cítrico; 0,9

g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,19 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>; 0,30 g L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,025 g L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 0,025 g L<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,035 g L<sup>-1</sup> de NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,050 g L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,009 g L<sup>-1</sup> de KI e 0,0125 g L<sup>-1</sup> de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>. Em seguida, esse meio contendo a levedura foi incubado por 12 horas, à temperatura de 28°C e velocidade de agitação de 150 rpm. Após o período de crescimento necessário para que as leveduras sejam capazes de atingir uma densidade óptica, esse meio líquido foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos. A biomassa microbiana proveniente do processo de centrifugação foi recuperada e ressuspensa em água destilada estéril até a concentração de uma densidade óptica em leitura espectrofotométrica a 610 nm (D.O<sub>610 nm</sub>). As condições de investigação dos parâmetros mencionados se encontram descritos a seguir:

#### 4.4.6.2 Investigação da temperatura

A investigação da temperatura foi realizada nos meios YEP MX como descrito anteriormente. Após inóculo, os meios fermentativos foram submetidos a incubação na velocidade de agitação de 150 rpm nas temperaturas de 26 °C, 28 °C e 30°C e pH 5.2. A velocidade de agitação de 150 rpm foi utilizada nesse primeiro ensaio, devido ter sido empregada em pesquisas anteriores destas linhagens (VALINHAS; 2017; BARBOSA, 2017).

A temperatura obtida como melhor resultado para a produção de etanol no bioprocessamento, foi selecionada para a investigação da velocidade de agitação a 50 e 100, além da rotação estudada, 150 rpm. Cabe ressaltar que as velocidades de agitação de 50 e 100 rpm surgiram da curiosidade em obter respostas quanto ao desempenho das linhagens estudadas empregando a temperatura selecionada para a produção de etanol. Os processos fermentativos foram monitorados a cada 12 horas quanto ao crescimento celular (densidade óptica e contagem de células), teor de açúcar (D-xilose) e álcoois (etanol, xilitol e glicerol).

**a) crescimento celular:** Foi avaliado por densidade óptica e contagem de células (viáveis e inviáveis) conforme descrito no item 4.4.5.

**b) teor de açúcar:** A concentração de D-xilose foi avaliada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959) e pela técnica de CLAE, conforme descrito no item 4.2.3. A quantificação de açúcar pelo método de DNS foi realizada em triplicada e microplacas, utilizando 100 µL do meio fermentativo (centrifugado e devidamente diluído em água destilada), seguidos por adição de 100 µL do reagente de DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico) e deixados em banho de água fervente (70±1 °C) por um período de 25 minutos. Após o resfriamento dos constituintes, procedeu-se a leitura da intensidade de cor formada pelo método

colorimétrico em espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva analítica, utilizando xilose a  $1 \text{ g L}^{-1}$  como padrão, foi preparada a fim de se obter a regressão linear para o cálculo da concentração de xilose presentes nas amostras. Os teores de xilose foram calculados em  $\text{g L}^{-1}$ .

**c) teor de álcool:** A concentração de etanol, xilitol e glicerol foram mensuradas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com uso do sistema Shimadzu Prominence FPLC 20A, equipado com coluna Rezex ROA-Shodex® (300 x 7.5 mm), conforme os parâmetros operacionais e padrão descritos na Tabela 3 e 4.

**Tabela 3:** Padrões utilizados para a quantificação de xilitol e etanol pela técnica CLAE.

<b>Padrões</b>	<b>Concentrações</b>
<b>Xilitol</b>	$10 \text{ g L}^{-1}$
<b>Etanol</b>	$10 \text{ g L}^{-1}$
<b>Glicerol</b>	$10 \text{ g L}^{-1}$

**Tabela 4:** Condições operacionais das análises realizadas por CLAE para determinação de açúcares e álcool.

<b>Eluente</b>	Ácido sulfúrico $\text{H}_2\text{SO}_4$ $0,0025 \text{ mol L}^{-1}$
<b>Vazão de fase móvel</b>	$0,6 \text{ mL min}^{-1}$
<b>Volume de amostra (loop)</b>	$5 \mu\text{L}$ .
<b>Temperatura externa (coluna)</b>	$60^\circ\text{C}$
<b>Temperatura interna (detector)</b>	$40^\circ\text{C}$

O processo fermentativo foi avaliado ainda, quanto aos parâmetros de rendimento em etanol ( $Y_{p/s} \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$ ), quanto produtividade volumétrica de etanol ( $Q_p \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), eficiência fermentativa, Ef (%) e fator de rendimento de açúcares em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) :(HISS, 2013)., conforme descritos a seguir:

**a) Fator de rendimento de produção de etanol -  $Y_{p/s} \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$**

O fator de rendimento em etanol foi calculado pela relação entre o valor de etanol produzido em gramas e os açúcares totais consumidos em gramas. Os resultados foram expressos em  $\text{g}_{\text{produto}} \text{ g}_{\text{substrato}}^{-1}$ . O cálculo foi baseado na Equação 8.



$$Y_{p/s} = \frac{P}{S_i - S_f} \quad \text{Equação (8)}$$

$Y_{p/s}$  = rendimento em etanol ( $g_p g_s^{-1}$ )

$P$  = concentração final de etanol ( $g L^{-1}$ )

$S_i$  = concentração inicial de açúcar presente no meio ( $g L^{-1}$ )

$S_f$  = concentração final de açúcar presente no meio ( $g L^{-1}$ )

#### b) Produtividade volumétrica de etanol - $Q_p g L^{-1} h^{-1}$

A produtividade volumétrica de etanol foi expressa com base na quantidade de etanol produzido ( $g L^{-1}$ ) por tempo de fermentação (h) e, calculada de acordo com a Equação 9, a seguir:

$$Q_p = \frac{P}{t} \quad \text{Equação (9)}$$

$Q_p$  = produtividade volumétrica ( $g L^{-1} h^{-1}$ )

$P$  = concentração final de etanol ( $g L^{-1}$ )

$t$  = tempo de fermentação (h)

#### c) Eficiência Fermentativa - $E_f$ (%)

A eficiência fermentativa, expressa em %, representa a razão entre o fator de rendimento ( $Y_{p/s} g_p g_s^{-1}$ ) obtido experimentalmente e o fator de rendimento teórico ( $Y_t$ ) de  $0,511 g g^{-1}$  de glicose e/ou xilose consumida. Os valores foram obtidos por meio da Equação 10, a seguir:

$$E_f = \frac{Y_{p/s}}{0,511} \times 100 \quad \text{Equação (10)}$$

$E_f$  = eficiência fermentativa (%)

$Y_{p/s} g_p g_s^{-1}$  = rendimento em etanol ( $g g^{-1}$ )

#### d) Taxa específica de crescimento celular - $\mu x$

A taxa específica de crescimento é calculada de acordo com a Equação 11 abaixo:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad \text{Equação (11)}$$

$X$  = massa celular final ( $g L^{-1}$ )

$X_0$  = massa celular inicial ( $g L^{-1}$ )

t= tempo final (fase exponencial)

**e) Tempo de geração - t<sub>g</sub>**

O tempo de geração ou duplicação de um micro-organismo é definido como o tempo necessário para que ocorra formação de 2 novas células a partir da célula existente. Os valores são cálculos baseado na Equação 12:

$$t_g = \frac{t}{n} \quad \text{Equação (12)}$$

$$X = X_0 \times 2^n$$

$$\text{Log } X = \text{log } X_0 + n \log 2$$

**X**= massa celular final (g L<sup>-1</sup>)

**X<sub>0</sub>**= massa celular inicial (g L<sup>-1</sup>)

t= tempo final (fase exponencial)

t<sub>g</sub>= tempo de geração

n= número de gerações

**f) Fator de rendimento de açúcares em biomassa - (Y<sub>x/s</sub>)**

O fator de conversão, o qual se expressa a massa de biomassa produzida por massa de xilose consumida em gramas, foi calculada pela seguinte equação:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X - X_f - X_0}{\Delta S - S_f - S_0}$$

Onde, X<sub>f</sub> e X<sub>0</sub>, concentração final e concentração inicial de células livres, S<sub>f</sub> e S<sub>0</sub> concentração final e inicial de açúcares.

**4.4.6.3 Investigação da velocidade de agitação**

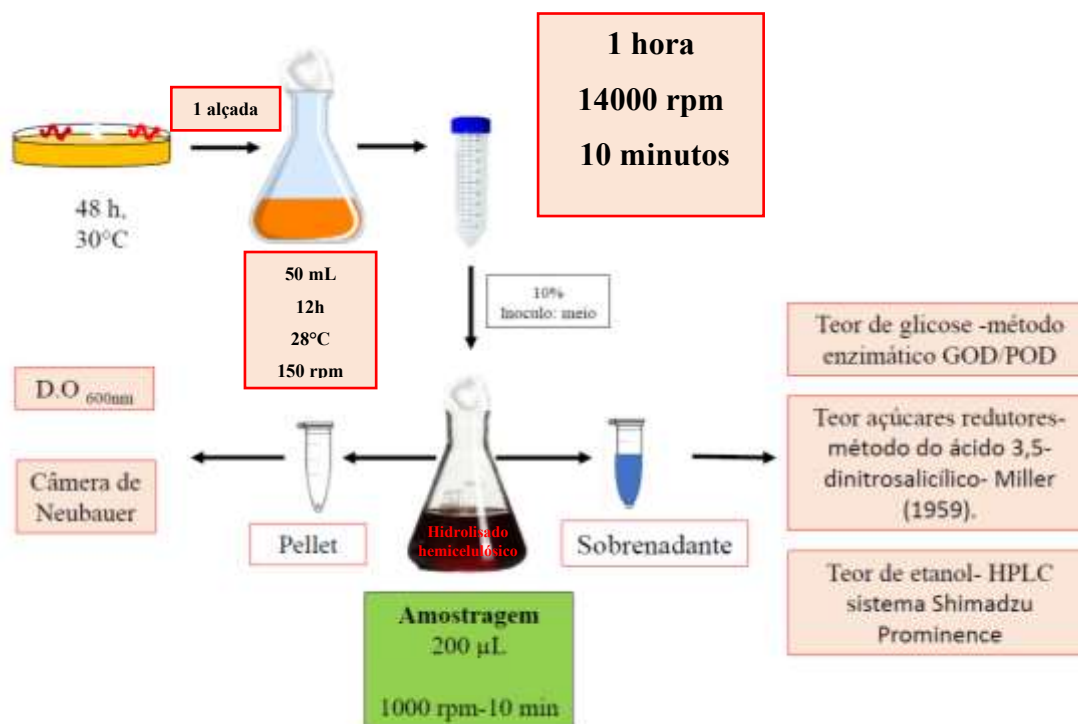
A investigação da velocidade de agitação foi realizada no meio YEP<sub>MX</sub> descrito no item 4.4.6, seguida de inóculo das linhagens de levedura *G. geotrichum* UFVJM-R10, *C. akabanensis* UFVJM-R131, e *C. orthopsilosis* UFVJM-4G, para cada bioprocessos. A investigação foi conduzida na temperatura selecionada conforme mencionado acima, nas velocidades de 50, 100 e 150 rpm. Os processos fermentativos foram monitorados a cada 12, como já descrito acima.

#### 4.4.6.4 Investigação da influência do pH

A investigação da influência do pH também foi realizada no meio YEPMX como já descrito anteriormente empregando a melhor temperatura e velocidade de agitação encontrada no ensaio anterior. As condições dos processos foram avaliadas em meios com pH ajustados 4.2, 5.2 e 6.2. Os processos fermentativos foram monitorados a cada 12, como já descrito anteriormente.

#### 4.5 Processo fermentativo utilizando hidrolisado lignocelulósico

O ensaio fermentativo esquematizado na Figura 13, foi realizado em batelada simples e conduzido em frascos cônicos tipos Erlenmeyer de 125 mL utilizando o hidrolisado lignocelulósico em duas condições: hidrolisado hemicelulósico destoxificado e não destoxificado. O hidrolisado destoxificado foi realizado conforme o item 4.2. Os hidrolisados foram acondicionados em Erlenmeyer de 125 mL e levados para esterilização á 121°C, 1 atm por 3 minutos, seguido para a aferição do pH em amostras não utilizadas no processo fermentativo. O processo fermentativo foi realizado utilizando as condições operacionais selecionadas como descritas no item 4.3.



Fonte: BARBOSA, 2017 (adaptada)

**Figura 13:** Fluxograma da quarta etapa: fermentação utilizando diferentes hidrolisados hemicelulósicos para produção de etanol utilizando linhagens fermentadoras de D-xilose.

#### **4.5.1 Preparo do inóculo**

O inóculo foi preparado por meio da transferência de uma alçada das linhagens de leveduras utilizando o meio sintético proposto por Oliveira (2010) descrito no item 4.3 e seguido para incubação por 12 h, à 28°C e 150 rpm.

##### **4.5.1.1 Fermentação a partir de hidrolisado de torta de caroço de algodão não destoxificado**

O ensaio fermentativo foi realizado em três repetições contendo 50 mL de hidrolisado não destoxificado e 10% de inóculo preparado como descrito no item 4.7.1. O hidrolisado contendo as células foi colocado em estufa com agitação orbital a 28°C, 100 rpm e pH 6,2. A investigação de todos os parâmetros fermentativos foi monitorada a cada 12 horas quanto ao:

**a) crescimento celular:** conforme a metodologia de densidade ótica e contagem de células como no item 4.4.5.

**b) teores de açúcares:** concentração de D-xilose e D-arabinose foram quantificados de acordo com o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, descrito por Miller (1959) e a técnica de CLAE, conforme o item 4.2.3.

**c) concentração de D-glicose:** conforme o procedimento padrão enzimático Glicose-oxidase/peroxidase-GOD/POD (LLOYDE; WHELAN, 1969), descrito a seguir e a técnica de CLAE, conforme o item 4.2.3. O teor de glicose foi realizado seguindo o procedimento padrão enzimático Glicose-oxidase/peroxidase-GOD/POD (LLOYDE; WHELAN, 1969). A quantificação pelo método enzimático GOD/POD por meio do Kit enzimático GLICOSE Liquiforme, LABTEST® utilizou glicose a 1 g L<sup>-1</sup> como padrão. Aliquotas de 10 µL do sobrenadante proveniente do processo fermentativo com concentração máxima de 5,0 g L<sup>-1</sup> (limite de linearidade do teste) foram adicionadas nas microplacas com adição de 300 µL da solução enzimática. O padrão foi preparado a partir da adição de 10 µL da solução de glicose a 1 g L<sup>-1</sup>, nas mesmas condições já retratada anteriormente. As microplacas foram colocadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos e depois do resfriamento foi determinado a absorbância em espectrofotômetro a 510 nm.

**d) concentração de etanol, xilitol e glicerol,** conforme a metodologia de CLAE, seguindo os parâmetros operacionais conforme o item 4.2.3;

**e) concentrações dos inibidores** (ácido acético, furfural e 5-HMF) também pela metodologia de CLAE, utilizando os padrões e parâmetros operacionais descrito no item 4.2.3.

O processo fermentativo foi avaliado ainda, quanto aos parâmetros de rendimento em etanol ( $Y_p/s$   $g\ g^{-1}$ ), quanto produtividade volumétrica de etanol ( $Q_p$   $g\ L^{-1}\ h^{-1}$ ), eficiência fermentativa, Ef (%) e fator de rendimento de açúcares em biomassa ( $Y_x/s$ ), conforme descritos anteriormente.

#### **4.5.1.2 Fermentação utilizando hidrolisados de torta de caroço de algodão destoxificado**

O ensaio fermentativo contendo 50 mL de hidrolisado destoxificado foi realizado conforme descrito no item 4.7.1.1. O hidrolisado destoxificado contendo as linhagens de leveduras foi colocado em estufa com agitação orbital a 28°C, 100 rpm e pH 6,2. Os processos fermentativos foram monitorados a cada 12 h e avaliado os parâmetros de rendimento como já descrito acima.

### **4.6 Análises estatísticas**

Os ensaios fermentativos foram conduzidos com três repetições e as análises do monitoramento do processo foram realizadas em triplicatas. Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de significância. As análises serão conduzidas utilizando o software ASSISTAT-Versão7.7–2017.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização química do resíduo sólido remanescente do pré-tratamento da torta do caroço de algodão

No resíduo sólido remanescente ao processo de pré-tratamento foram recuperados  $46,33 \pm 1,18\%$  de celulose,  $10,85 \pm 0,27\%$  de hemicelulose e  $15,57 \pm 0,30\%$  de lignina. As quantificações das frações de carboidratos e lignina presentes nos resíduos antes e após tratamento químico estão descritas na Tabela 5. Nesse estudo, também foi calculado os valores de FDA e FDN do resíduo sólido, sendo  $42,80\%$  e  $53,65\%$ , respectivamente, resultados utilizados para os cálculos do teor de celulose, hemicelulose e lignina. O efeito do pré-tratamento na torta de caroço de algodão também pode ser observado na Tabela 6, onde a hemicelulose apresentava uma massa inicial na biomassa de  $159,56$  g, enquanto no resíduo sólido de  $77,30$  g, assim, mostra a eficiência do processo.

**Tabela 5:** Composição química da torta de caroço de algodão antes e após o pré-tratamento químico.

Frações	Fração sólida da Torta de caroço de algodão (%)	
	Antes	Após
Celulose	$33,29 \pm 1,13^a$	$46,33 \pm 1,18^b$
Hemicelulose	$19,76 \pm 0,92^a$	$10,85 \pm 0,27^b$
Lignina	$14,27 \pm 0,08^a$	$15,57 \pm 0,30^a$

Valores nas linhas (médias  $\pm$  desvio-padrão) seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a  $p > 0,05$ .

Fonte: AUTOR

Segundo Santos (2012), utilizando a mesma torna de caroço de algodão, após o tratamento químico nas mesmas condições operacionais do presente estudo, o resíduo sólido apresentou teores de  $42,72\%$  celulose,  $5,77\%$  hemicelulose e  $24,17\%$  lignina. Silva (2012) avaliando o pré-tratamento com ácido diluído em torta de caroço de algodão, obteve uma redução de  $70\%$  de hemicelulose, enquanto a celulose aumentou  $12\%$  e a lignina  $13\%$ , quando comparada aos teores iniciais. Nesse estudo a redução foi de  $80\%$  de hemicelulose e um aumento em torno de  $13\%$  de celulose. Conforme a Tabela 5, o teor de lignina no resíduo sólido foi de  $15,57 \pm 0,30\%$ , enquanto na biomassa lignocelulósica antes do tratamento foi de  $14,27 \pm 0,08\%$ , não havendo diferença estatisticamente entre os teores. Esse mesmo resultado, pode ser observado na Tabela 6, em que a massa inicial da lignina foi de  $109,35$  g e a massa final de  $110,92$  g. De acordo com Shi *et al.* (2020), a hidrólise da lignina libera compostos fenólicos que mesmo em baixas concentrações, são considerados

citotóxicos na etapa de pré-tratamento. Portanto, a ausência de hidrólise da lignina nas condições trabalhadas no presente estudo, beneficia a produção de etanol utilizando as linhagens de leveduras.

**Tabela 6:** Balanço de massa da fração sólida resultante do pré-tratamento ácido da torta de caroço de algodão

Resíduos sólidos (g)	Massa total	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Inicial	809,00 <sup>a</sup>	269,32 <sup>a</sup>	159,86 <sup>a</sup>	109,35 <sup>a</sup>
Final	712,41 <sup>b</sup>	330,06 <sup>b</sup>	77,30 <sup>b</sup>	110,92 <sup>a</sup>

Valores nas colunas (médias  $\pm$  desvio-padrão) seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a  $p>0,05$ .

Fonte: AUTOR

## 5.2 Caracterização química do hidrolisado ácido da torta de caroço de algodão: não destoxificado e destoxificado

Na Tabela 7 encontra-se os valores obtidos no processo de hidrólise ácida da torta de caroço de algodão destoxificado e não destoxificado. No hidrolisado não destoxificado apresentou 19,97 g L<sup>-1</sup> de D-xilose, 6,95 g L<sup>-1</sup> de L-arabinose, 6,23 g L<sup>-1</sup> de D-glicose (Tabela 7).

**Tabela 7:** Composição química do hidrolisado ácido hemicelulósico proveniente da torta de algodão após o pré-tratamento químico com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído (destoxificado e não destoxificado)

Componentes (g L <sup>-1</sup> )	Não destoxificado	Destoxificado
D-Glicose	6,23 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	5,76 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
D-Xilose	19,97 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	18,80 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
L-Arabinose	6,95 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	5,29 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>
Açúcares redutores	42,80 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	40,02 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
Glicerol	0,90 $\pm$ 0,00 <sup>e</sup>	1,08 $\pm$ 0,00 <sup>e</sup>
Ácido acético	2,85 $\pm$ 0,00 <sup>f</sup>	2,82 $\pm$ 0,00 <sup>f</sup>
Furfural	1,65 $\pm$ 0,00 <sup>g</sup>	0,17 $\pm$ 0,00 <sup>h</sup>
5-hidroximetilfurfural	0,17 $\pm$ 0,00 <sup>i</sup>	0,04 $\pm$ 0,00 <sup>j</sup>

Valores nas linhas (médias  $\pm$  desvio-padrão) seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a  $p>0,05$ .

Fonte: AUTOR

Silva (2012) estudando um processo de otimização do pré-tratamento ácido diluído na torta de caroço de algodão, no hidrolisado formado a concentração de açúcar redutor foi de 59,23 g L<sup>-1</sup> enquanto no presente estudo foi encontrada uma concentração de 42,80 g L<sup>-1</sup>.

O pré-tratamento da torta de caroço de algodão utilizado no presente estudo, além de liberar os carboidratos, produziu os compostos inibidores como o ácido acético na concentração na

2,85±0,00 g L<sup>-1</sup>, furfural na concentração de 1,65±0,00 g L<sup>-1</sup> e 5-hidroximetilfurfural (HMF) na concentração de 0,17±0,00 g L<sup>-1</sup> (Tabela 7). Conforme Santos (2012), estudando a hidrólise ácida da torta de caroço de algodão nas mesmas condições operacionais, em seu hidrolisado formado apresentou ácido acético na concentração de 2,25 g L<sup>-1</sup>, o furfural na concentração de 1,65 g L<sup>-1</sup> e 5-hidroximetilfurfural (HMF) na concentração de 0,17 g L<sup>-1</sup>, corroborando com os resultados do presente estudo.

Visando diminuir os possíveis impactos causados pelos compostos citotóxicos, foi proposto a etapa de destoxificação segundo Brito *et al.* (2017). Após o tratamento com carvão ativado os teores de furfural que inicialmente eram de 1,65 g L<sup>-1</sup> reduziu para 0,17 g L<sup>-1</sup>, a concentração do HMF também foi reduzida, sendo inicialmente de 0,17 g L<sup>-1</sup> e no final do tratamento de 0,04 g L<sup>-1</sup>. O ácido acético estatisticamente não apresentou diferença na concentração após o tratamento com o carvão ativado, apresentando inicialmente a concentração de 2,82 g L<sup>-1</sup> e ao final do tratamento uma concentração de 2,82 g L<sup>-1</sup>.

O tratamento de destoxificação com carvão ativado, segundo Brito (2017), também não alterou estatisticamente os valores dos carboidratos, apresentando no hidrolisado destoxificado D-Xilose na concentração de 18,80 g L<sup>-1</sup>, L-arabinose na concentração de 5,29 g L<sup>-1</sup> e D-glicose na concentração de 5,76 g L<sup>-1</sup>, resultado promissor para a produção de etanol lignocelulósico.

### 5.3 Micro-organismos

#### 5.3.1 Autenticação dos micro-organismos

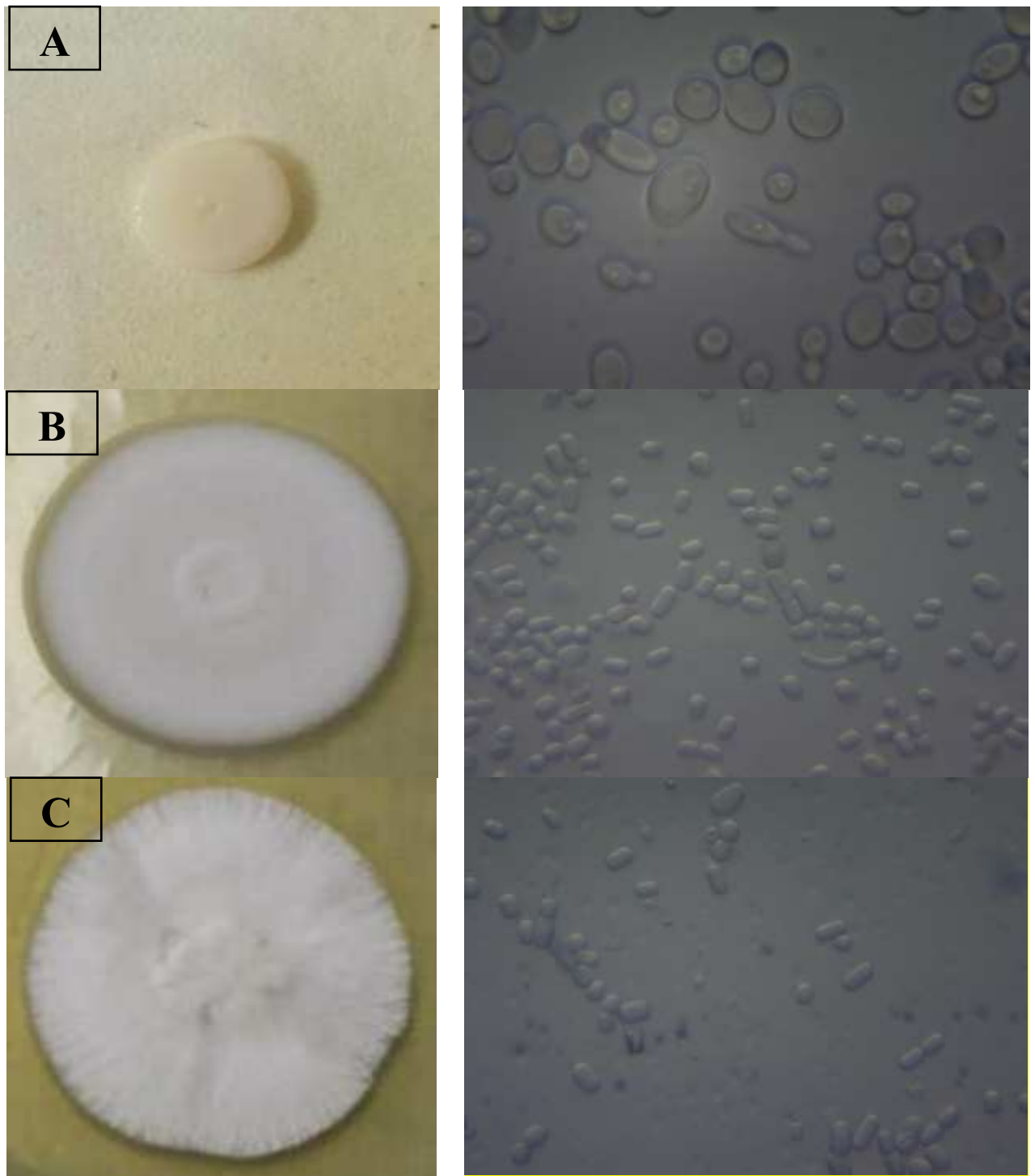
As linhagens de leveduras estudadas apresentaram tamanhos de halo de crescimento entre 0,8 e 6,0 cm, conforme representado na Tabela 8.

**Tabela 8:** Tamanho das linhagens *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, *Candida akabanensis* UFVJM-R131, *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G estudadas durante 7 dias, no meio YEP MX

IDENTIFICAÇÃO	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 7
<i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G	0,8 cm	1,0 cm	1,2 cm	2,4 cm
<i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10	1,2 cm	2,3 cm	3,2 cm	6,0 cm
<i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131	1,1 cm	2,1 cm	2,8 cm	6,0 cm

Fonte: AUTOR





**Figura 14:** Aspecto macroscópico e microscópico das linhagens de leveduras com 7 dias e 48 horas de cultivo em meio YEPMX, respectivamente. Imagens com aumento de 100x e barra de escala = 5 $\mu$ m A) *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G, B) *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 e C) *Candida akabanensis* UFVJM-R131.

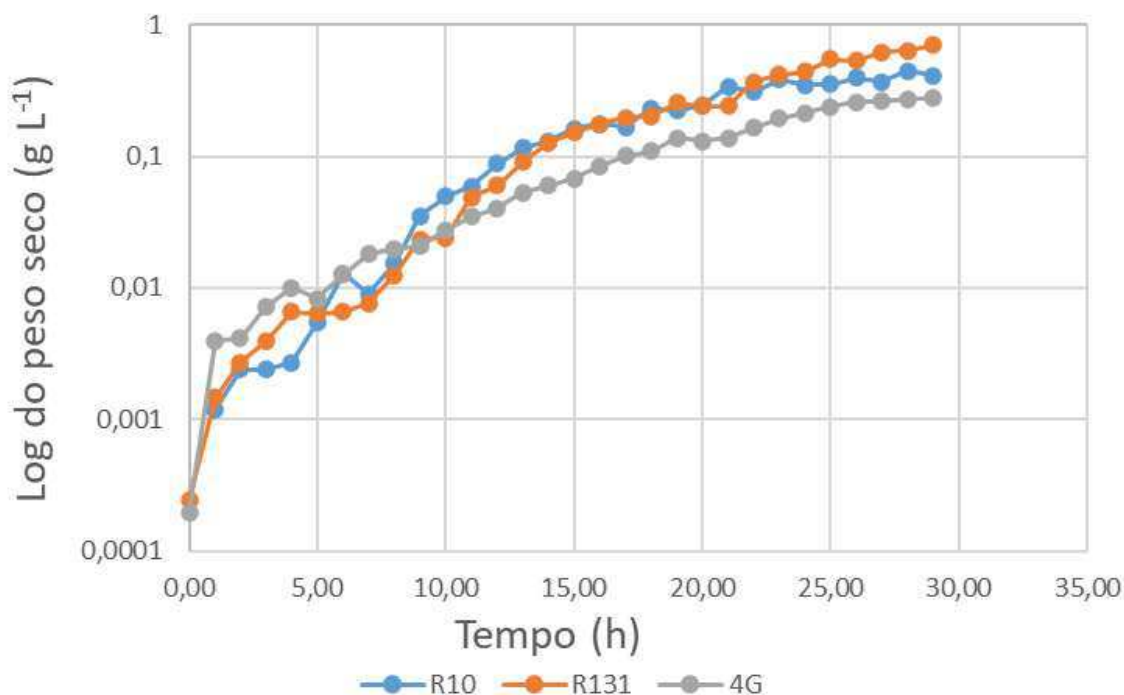
Na Figura 14 encontram-se as imagens macroscópicas e microscópicas das linhagens de leveduras A) *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G, B) *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 e C) *Candida akabanensis* UFVJM-R131 com 7 dias e 48 horas de cultivo em meio YEPMX, respectivamente. A *C. orthopsilosis* (UFVJM-4G) durante 7 dias de cultivo apresentou coloração

creme e o crescimento em radial, com um crescimento de 2,4 cm e microscopicamente com 48 horas de cultivo apresentou células oblongas e ovaladas, bem como a presença de blastoconídios e ascósporos, com a reprodução por brotamento. Barbosa (2017), estudando essa linhagem também observou essas características.

A linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 em 7 dias de cultivo apresentou crescimento radial, com a borda filamentosa, coloração branca e um tamanho de 6,0 cm, microscopicamente e com 48 horas de cultivo, a linhagem apresentou células cilíndricas com presença hifas verdadeiras, tubo germinativo positivo e presença de clamidósporos. Valinhas (2017), estudando essa linhagem também observou essas características. A linhagem de levedura *Candida akabanensis* (UFVJM-R131) após 7 dias de crescimento apresentou macroscopicamente colônia cremosa com aspecto de superfície, borda lisa e perfil achatado, tamanho de 6,0 cm, microscopicamente em 48 horas de cultivo apresentou células globosas e ovoides, bem como a formação de pseudo-hifas e brotamento unilateral, corroborando com os estudos de Valinhas (2017) e Barbosa (2017).

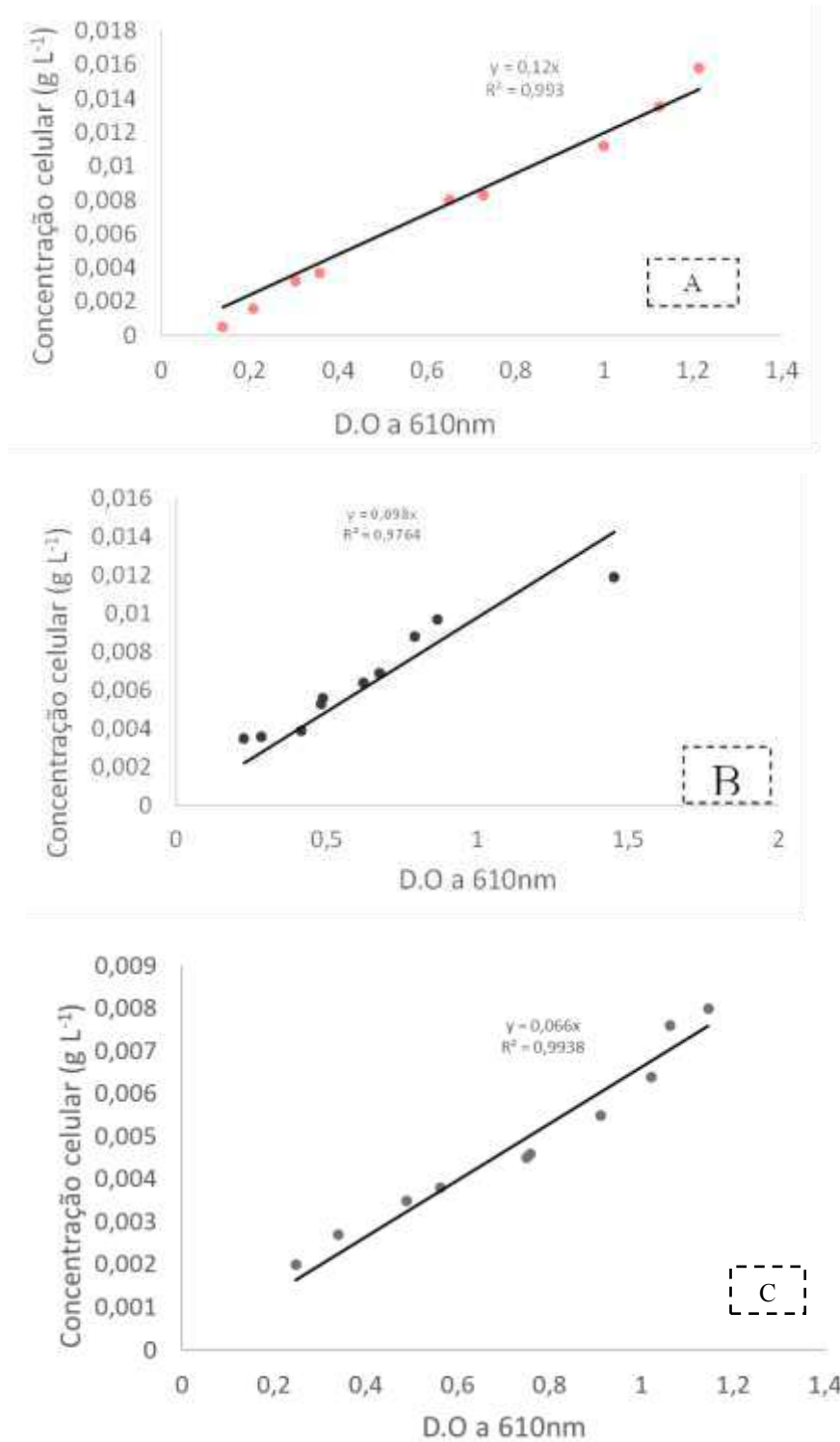
### 5.3.2 Perfil de crescimento das linhagens

O perfil de crescimento celular das linhagens de *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, *Candida akabanensis* UFVJM-R131, *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G inoculadas em meio sintético (OLIVEIRA; 2010) a 28°C e 150 rpm, se encontra na Figura 15.



Fonte: AUTOR

**Figura 15:** Perfil do crescimento celular das linhagens A) *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, B) *Candida akabanensis* UFVJM-R131 e C) *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G em meio sintético (OLIVEIRA; 2010) a 28°C, 150 rpm e por 29 horas.



Fonte: AUTOR

**Figura 16:** Curvas de correlação entre concentração celular em massa seca (g) e densidade ótica a 610 nm para as linhagens de A) *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, B) *Candida akabanensis* UFVJM-R131, C) *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G.

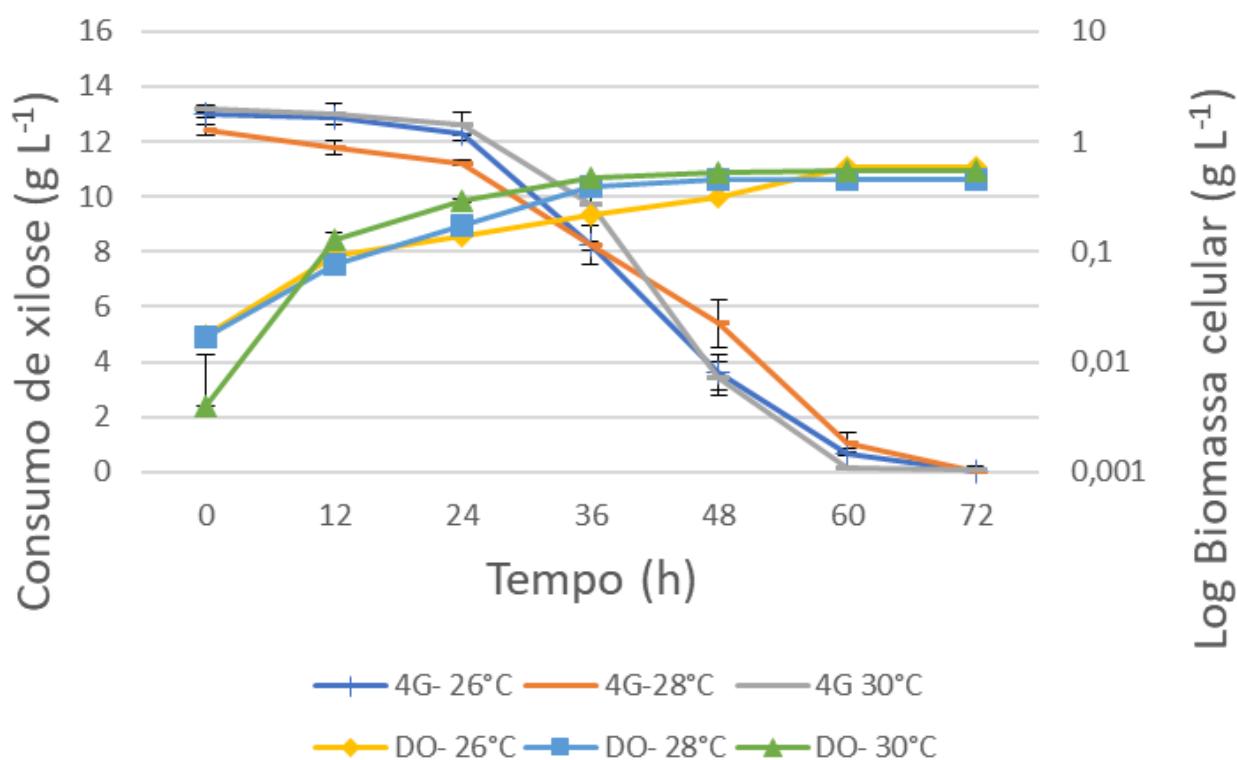
Na fase Lag ou fase de latência o crescimento celular é praticamente nulo devido à adaptação das células, neste estudo esta fase praticamente não foi notada para nenhuma das linhagens de leveduras estudadas, conforme ilustrado na Figura 15. A fase exponencial (fase *Log*) apresentou o mesmo comportamento entre as linhagens, com início nas primeiras 5 horas de fermentação e término cerca de 20 horas após a inoculação dos micro-organismos. No final da fase *Log* foi observado uma população de células de 0,016 g L<sup>-1</sup> para a linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10; 0,008 g L<sup>-1</sup> para a *Candida akabanensis* UFVJM-R131 e 0,012 g L<sup>-1</sup> para a *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G conforme observado na Figura 16. As velocidades de crescimentos foram de 0,13 µx h<sup>-1</sup> para a *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, 0,16 µx h<sup>-1</sup> para a *Candida akabanensis* UFVJM-R131 e 0,12 µx h<sup>-1</sup> para a *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G. O tempo de geração para as linhagens de leveduras foram de 5,2 horas para a *G. geotrichum* UFVJM-R10, 4,2 horas para a *C. akabanensis* UFVJM-R131 e 5,6 horas para *C. orthopsilosis* UFVJM-4G. Na Figura 16 se encontra a curva de correlação entre massa seca e densidade ótica a 610nm utilizada para o monitoramento da concentração celular nos experimentos fermentativos subsequentes.

### **5.3.3 Investigação dos parâmetros fermentativos para a melhoria na produção de etanol**

A investigação fermentativa é uma valiosa contribuição para o conhecimento de micro-organismos não convencionais, tais como *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, *Candida akabanensis* UFVJM-R131 e *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G, em relação as melhores condições experimentais, relacionadas a temperatura, velocidade de agitação e pH, contribuindo assim, para uma maior produção de etanol. Du Preez (1994) reporta que o efeito dos fatores como pH, temperatura, oxigenação, concentração de nutrientes e concentração de massa celular é fator chave para a melhoria no desempenho sobre o processo de fermentação de pentose a etanol. Nesse sentido foram obtidos os resultados mencionados a seguir:

#### **5.3.3.1 Investigação da temperatura**

A temperatura desempenha um papel importante na produção de bioetanol, segundo Menezes (2019), esse parâmetro pode afetar diretamente a atividade da levedura e indiretamente a taxa de conversão dos açúcares em álcool durante o processo fermentativo. A cinética da fermentação das linhagens de leveduras em meio YEPXM a 150 rpm, pH 5.2 e essas diferentes temperaturas, encontra-se descrita nas Figuras 17, 18 e 19.



Fonte: AUTOR

**Figura 17:** Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G conduzida a 150 rpm nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C.

A linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G a 150 rpm e pH 5.2 foi capaz de consumir totalmente a xilose, todavia não produziu etanol em nenhuma das temperaturas estudadas, conforme apresentado na Tabela 9. Barbosa (2017) estudando essa linhagem a 28°C, 150 rpm em meio sintético, YEPMG (10 g L<sup>-1</sup> de xilose, 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 2,0 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>), observou uma produção de etanol com rendimento de Y<sub>P/S</sub> de 0,20 g g<sup>-1</sup> em 89 h. Este fato se deve a presença de glicose utilizada como fonte de carbono, a qual não foi utilizada no meio de fermentação utilizada neste estudo. Esta hipótese também pode ser confirmada por Valinhas (2017), que estudando essa linhagem no mesmo meio de fermentação, entretanto, utilizando como fonte de carbono glicose além da xilose, observou Y<sub>P/S</sub> 0,35 g g<sup>-1</sup> de etanol. Govindaswamy e Vane (2007) reportaram que de modo geral, em meios fermentativos contendo as duas fontes de carbono, glicose e xilose, as leveduras utilizam preferencialmente a glicose. Esses autores reportaram ainda, que a cinética de crescimento das leveduras, se diferenciam quando o meio fermentativo contendo glicose, além da D-xilose.

A linhagem *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G apesar de não ter produzido etanol em nenhuma das temperaturas estudadas, foi capaz de produzir xilitol a 26°C e 28°C, com

concentrações de  $1,66 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  e  $2,16 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$  e rendimentos de  $Y_{P/S}$  de  $0,20 \text{ g g}^{-1}$  e  $0,15 \text{ g g}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 10).

Na Tabela 10 encontram-se ainda, os rendimentos de biomassa celular obtidos sendo estes  $Y_{X/S} = 0,071 \text{ g g}^{-1}$  na temperatura de  $26^\circ\text{C}$ ,  $Y_{X/S} = 0,102 \text{ g g}^{-1}$  na de  $28^\circ\text{C}$  e  $Y_{X/S} = 0,066 \text{ g g}^{-1}$  na temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , valores esses, que demonstra a utilização de xilose na manutenção do crescimento celular dessa levedura.

**Tabela 9:** Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G, a 150 rpm conduzidos em temperaturas  $26^\circ\text{C}$ ,  $28^\circ\text{C}$  e  $30^\circ\text{C}$  por 72 h.

PRODUTOS ( $\text{g L}^{-1}$ )	Temperatura		
	$26^\circ\text{C}$	$28^\circ\text{C}$	$30^\circ\text{C}$
Xilose	ND	ND	ND
Etanol	ND	ND	ND
Ácido acético	ND	ND	ND
Xilitol	$1,66 \pm 0,02$	$2,16 \pm 0,05$	ND

ND= Não detectado

Fonte: AUTOR

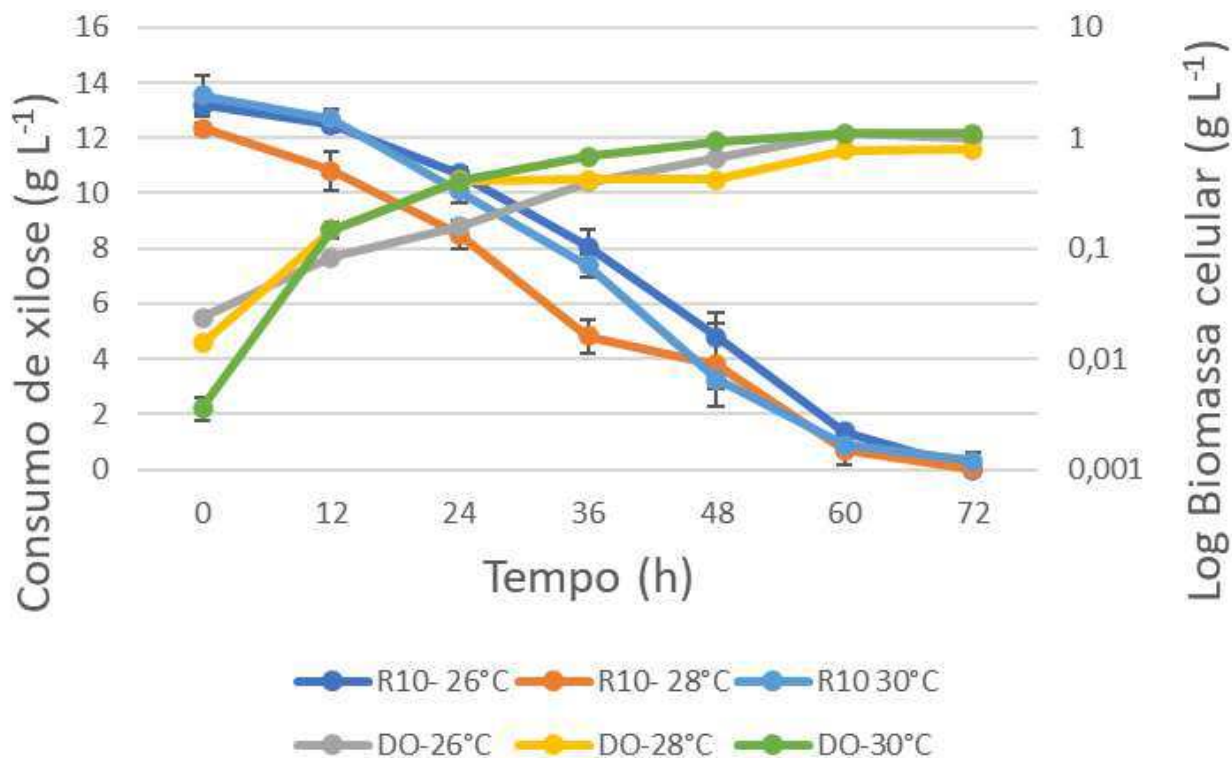
**Tabela 10:** Resultados dos Parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G, a 150 rpm conduzidos nas temperaturas  $26^\circ\text{C}$ ,  $28^\circ\text{C}$  e  $30^\circ\text{C}$ .

Temperatura	$Y_{P/S}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	$Q_P$ ( $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	Ef (%)	$Y_{X/S}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	TEMPO (h)	$Y_{P/S}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	$Q_P$ ( $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	Ef (%)
	Etanol	Etanol	Etanol	Biomassa		Xilitol	Xilitol	Xilitol
$26^\circ\text{C}$	-	-	-	0,071	72,00	0,15	-	-
$28^\circ\text{C}$	-	-	-	0,102	72,00	0,20	-	-
$30^\circ\text{C}$	-	-	-	0,066	72,00	-	-	-

$Y_{P/S}$  ( $\text{g g}^{-1}$ ): rendimento da conversão dos açúcares a álcool;  $Y_{X/S}$  ( $\text{g g}^{-1}$ ): rendimento da conversão dos açúcares a biomassa celular;  $Q_P$  ( $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ): Produtividade volumétrica de etanol; Ef (%): eficiência da fermentação alcoólica.

Fonte: AUTOR

Na Figura 18 encontra-se os resultados da cinética do bioprocesso utilizando a linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 em meio YEPMX conduzido sob rotação a 150 rpm, nas temperaturas de  $26^\circ\text{C}$ ,  $28^\circ\text{C}$  e  $30^\circ\text{C}$ . Essa linhagem, apesar de ter consumido toda a xilose presente no meio, não produziu etanol em nenhuma das temperaturas estudadas, conforme apresentado na Tabela 11. Nos estudos realizados por Barbosa (2017), com essa linhagem, foi observado uma produção de etanol  $1,00 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  a  $28^\circ\text{C}$  por 150 rpm, utilizando no meio de fermentação adicionado de glicose como fonte de carbono, além de xilose, não sendo observado nesse estudo.



Fonte: AUTOR

**Figura 18:** Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 conduzida a 150 rpm nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C.

Na Tabela 12 encontram-se descritos os rendimentos de biomassa celular obtidos, sendo estes:  $Y_{X/S} = 0,079 \text{ g g}^{-1}$  a 26°C,  $Y_{X/S} = 0,158 \text{ g g}^{-1}$  a 28°C e  $Y_{X/S} = 0,088 \text{ g g}^{-1}$  a 30°C. Este fato pode estar atrelado ao uso do substrato consumido para o seu crescimento e ou para a formação de outros metabólitos não avaliados. Matos (2018) estudando essa linhagem em hidrolisado de torta de girassol suplementado, observou que com 92 horas de processo fermentativo, a levedura *Galactomyces geotrichum* entrou em estado de diauxia, ou seja, consumiu todo etanol produzido após o esgotamento de todos os monossacarídeos presentes no meio fermentativo, o que também pode ter ocorrido no presente estudo.

**Tabela 11:** Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEP MX utilizando a linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, a 150 rpm conduzidos em temperaturas 26°C, 28°C e 30°C por 72 h.

PRODUTOS (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura		
	26°C	28°C	30°C
Xilose	ND	ND	ND
Etanol	ND	ND	ND
Ácido acético	ND	ND	ND
Xilitol	ND	ND	ND

ND= Não detectado

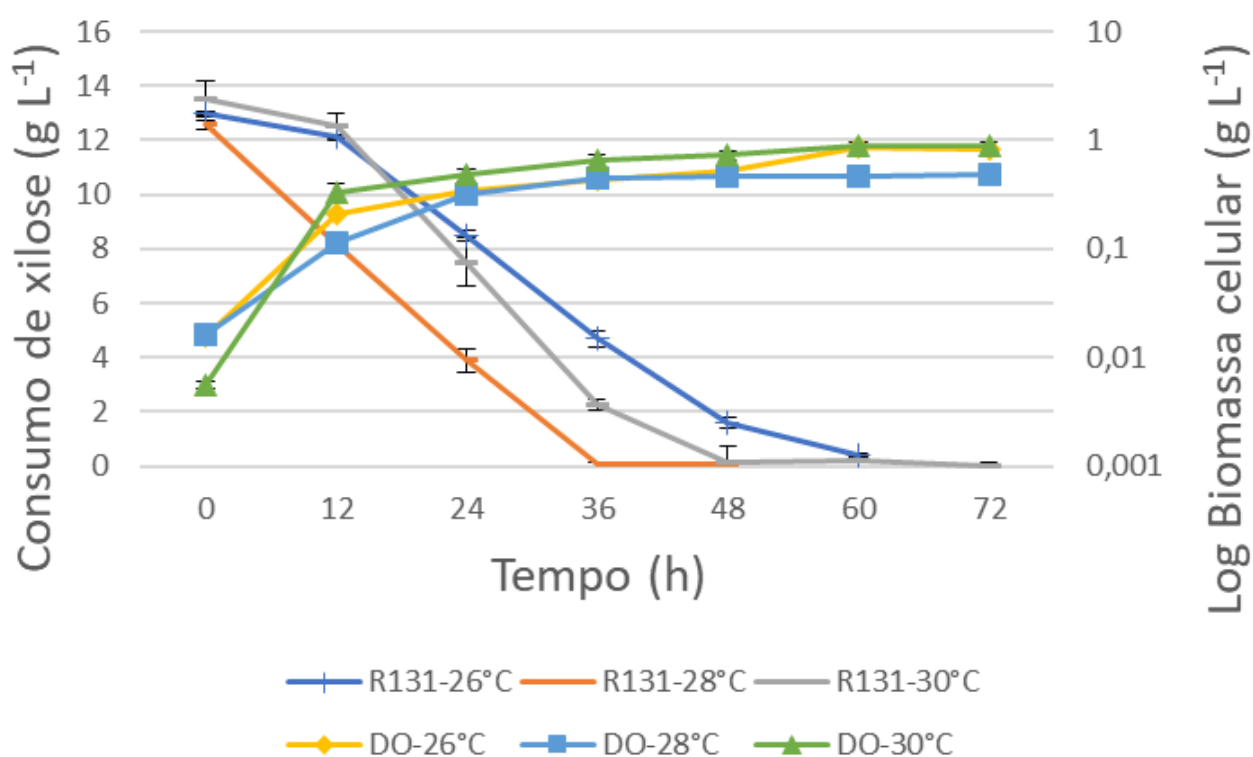
Fonte: AUTOR

**Tabela 12:** Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, a 150 rpm conduzidos nas temperaturas 26°C, 28°C e 30°C.

Temperatura	$Y_{P/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	$Q_P$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)	$Y_{X/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	TEMPO (h)	$Y_{P/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	$Q_P$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)
	Etanol	Etanol	Etanol	Biomassa		Xilitol	Xilitol	Xilitol
26°C	-	-	-	0,079	72,00	-	-	-
28°C	-	-	-	0,158	72,00	-	-	-
30°C	-	-	-	0,088	72,00	-	-	-

$Y_{P/S}$  (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a álcool;  $Y_{X/S}$  (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a biomassa celular;  $Q_P$  (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>): Produtividade volumétrica de etanol; Ef (%): eficiência da fermentação alcoólica.

Fonte: AUTOR



Fonte: AUTOR

**Figura 19:** Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131 conduzida a 150 rpm nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C.

A linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131 em meio sintético YEPMX com pH 5.2 conduzida em 150 rpm foi capaz de consumir totalmente a xilose, independente da temperatura empregada, contudo, apenas a 28°C foi observada a produção de etanol, com rendimento de 0,42 g g<sup>-1</sup>, eficiência fermentativa de 45,89% e taxa de produtividade de 0,07 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (Tabela 14). Valinhas (2017) observou em seus estudos que esta linhagem apresentou rendimento em etanol de 0,29 g g<sup>-1</sup> em meio sintético (YEPMG) utilizando glicose e xilose como fonte de



carbono. Os valores de rendimento foram 1,45 vezes maiores do que os relatados por Valinhas (2017), nas mesmas condições experimentais, tendo como único diferencial a fonte de carbono, ou seja, a adição de glicose ao meio fermentativo. Este autor observou ainda, que em processos fermentativos conduzidos com essa levedura, utilizando o meio sintético suplementado de minerais (OLIVEIRA,2010) (20,0 g L<sup>-1</sup> de D-xilose, 1,25 g L<sup>-1</sup> de ureia, 1,1 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 40 mL L<sup>-1</sup> da solução de micronutrientes (12,5 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 1,25 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, 12,5 g L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 0,9 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 0,19 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>, 0,3 g L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 0,025 g L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O, 0,025 g L<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O, 0,035 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>2</sub>44H<sub>2</sub>O, 0,05 g L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,009 g L<sup>-1</sup> de KI e Al(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 0,0125 g L<sup>-1</sup>) e apenas xilose como fonte de carbono, o valor de rendimento de 0,34 g g<sup>-1</sup> foi maior do que aquele obtido no meio contendo glicose e xilose (YEPMG). O valor obtido neste estudo, foi maior 1,45 vezes quando comparado aos encontrados nos estudos de Valinhas (2017) em meio sintético YEPMG e meio sintético Oliveira (2010). As condições mencionadas e os resultados obtidos sugerem que até no momento o uso apenas de xilose como fonte de carbono a 28°C sob agitação de 150 rpm, são as melhores condições para a produção de etanol.

**Tabela 13:** Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131, a 150 rpm conduzidos em temperaturas 26°C, 28°C e 30°C por 72 h.

PRODUTOS (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura		
	26°C	28°C	30°C
Xilose	ND	ND	ND
Etanol	ND	5,22±0,65	ND
Ácido acético	ND	ND	ND
Xilitol	ND	ND	ND

ND= Não detectado

Fonte: AUTOR

**Tabela 14:** Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131, a 150 rpm conduzidos nas temperaturas 26°C, 28°C e 30°C.

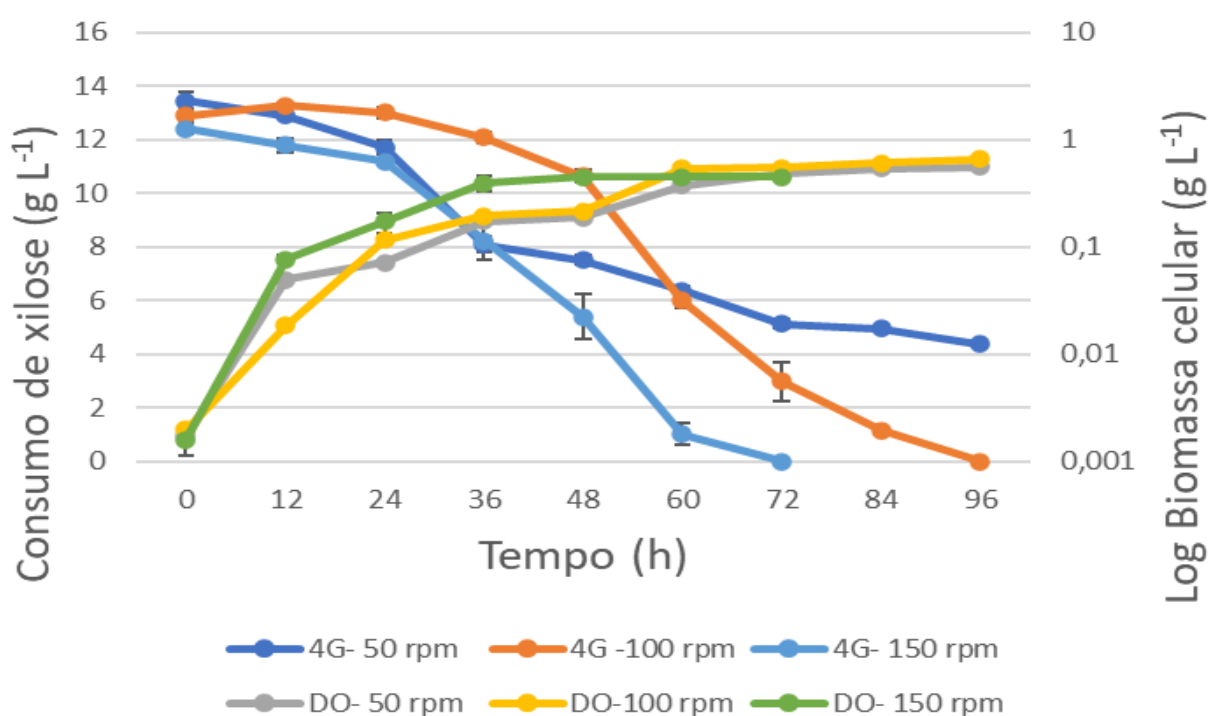
Temperatura	Y <sub>P/S</sub> (gg <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	E <sub>f</sub> (%)	Y <sub>X/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	TEMPO (h)	Y <sub>P/S</sub> (gg <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	E <sub>f</sub> (%)
	Etanol	Etanol	Etanol	Biomassa		Xilitol	Xilitol	Xilitol
26°C	-	-	-	0,045	60,00	-	-	-
28°C	0,42	0,07	45,89	0,096	36,00	-	-	-
30°C	-	-	-	0,050	72,00	-	-	-

Y<sub>P/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a álcool; Y<sub>X/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a biomassa celular; Q<sub>P</sub> (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>): Produtividade volumétrica de etanol; E<sub>f</sub> (%): eficiência da fermentação alcoólica.

Fonte: AUTOR

### 5.3.3.2 Investigação das velocidades de agitação

Os resultados de rendimento ( $0,42 \text{ g g}^{-1}$ ) e produção de etanol ( $5,22 \text{ g L}^{-1}$ ) obtidos nos ensaios de temperatura relacionados acima, despertaram a curiosidade quanto ao desempenho das linhagens estudadas frente a outras condições de agitação para a produção de etanol. A velocidade de agitação influencia no equilíbrio redox no meio fermentativo, uma vez que o nível de oxigênio dissolvido pode influenciar de forma direta no rendimento final da produção de etanol (RIZZI *et al.*, 1988; JEFFRIES, 2006; WATANABE *et al.*, 2007; MOYSÉS *et al.*, 2016). Neste sentido na Figura 20 foi possível observar o perfil cinético das linhagens estudadas frente a 50, 100 e 150 rpm.



Fonte: AUTOR

**Figura 20:** Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G conduzida a  $28^{\circ}\text{C}$  nas velocidades de agitação de 150 rpm, 100 rpm e 50 rpm.

Na Figura 20 encontra-se o perfil cinético fermentativo da linhagem *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G a  $28^{\circ}\text{C}$  no meio YEP MX com pH 5.2 nas velocidades de agitação 50, 100 e 150 rpm, quanto ao consumo de açúcar e o crescimento celular. Na velocidade de agitação de 50 rpm, a linhagem *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G não consumiu totalmente a xilose. Ao final de 96 horas foi observado um remanente de  $4,82 \pm 1,52 \text{ g L}^{-1}$  de xilose no meio fermentativo, nessa condição de agitação (Tabela 15). Nessa condição também foi observado que não houve produção de etanol e nem mesmo de xilitol, no entanto apresentou rendimento de  $Y_{X/S} = 0,106 \text{ g g}^{-1}$  de biomassa celular,

o que indica provavelmente, que a fonte de carbono disponível foi utilizada para a manutenção do crescimento da célula.

No ensaio fermentativo utilizando a velocidade de agitação de 100 rpm, a linhagem *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G foi capaz de consumir totalmente a xilose, e ainda de produzir  $4,63 \pm 0,07$  g L<sup>-1</sup> de etanol, com rendimento de etanol de  $Y_{P/S}$  0,38 g g<sup>-1</sup>, taxa de produtividade de 0,05 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e 41,99% de eficiência fermentativa, conforme apresentado na Tabela 16. No ensaio utilizando a velocidade de agitação de 150 rpm, a linhagem *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G produziu  $2,16 \pm 0,05$  g L<sup>-1</sup> de xilitol, com rendimento de 0,21 g g<sup>-1</sup>, por 72 h a 28°C. Barbosa (2017) estudando essa levedura, observou 0,20 g g<sup>-1</sup> de rendimento de etanol conduzido a 28°C, 150 rpm em meio sintético composto por 10 g L<sup>-1</sup> de xilose, 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, 0,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 2,0 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>. As condições mencionadas e os resultados obtidos sugerem a velocidade de agitação e a composição do meio fermentativo influenciam de forma direta a produção de etanol pela levedura *Candida orthopsilosis*.

**Tabela 15:** Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEP MX utilizando a linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G conduzidos a 28°C e diferentes velocidades de agitação por 72 e 96 h.

PRODUTOS (g L <sup>-1</sup> )	Velocidade de agitação		
	50 rpm	100 rpm	150 rpm
Xilose	4,82±1,52	0,75±0,17	ND
Etanol	ND	4,63±0,07	ND
Ácido acético	ND	ND	ND
Xilitol	ND	ND	2,16±0,05

ND= Não detectado

Fonte: AUTOR

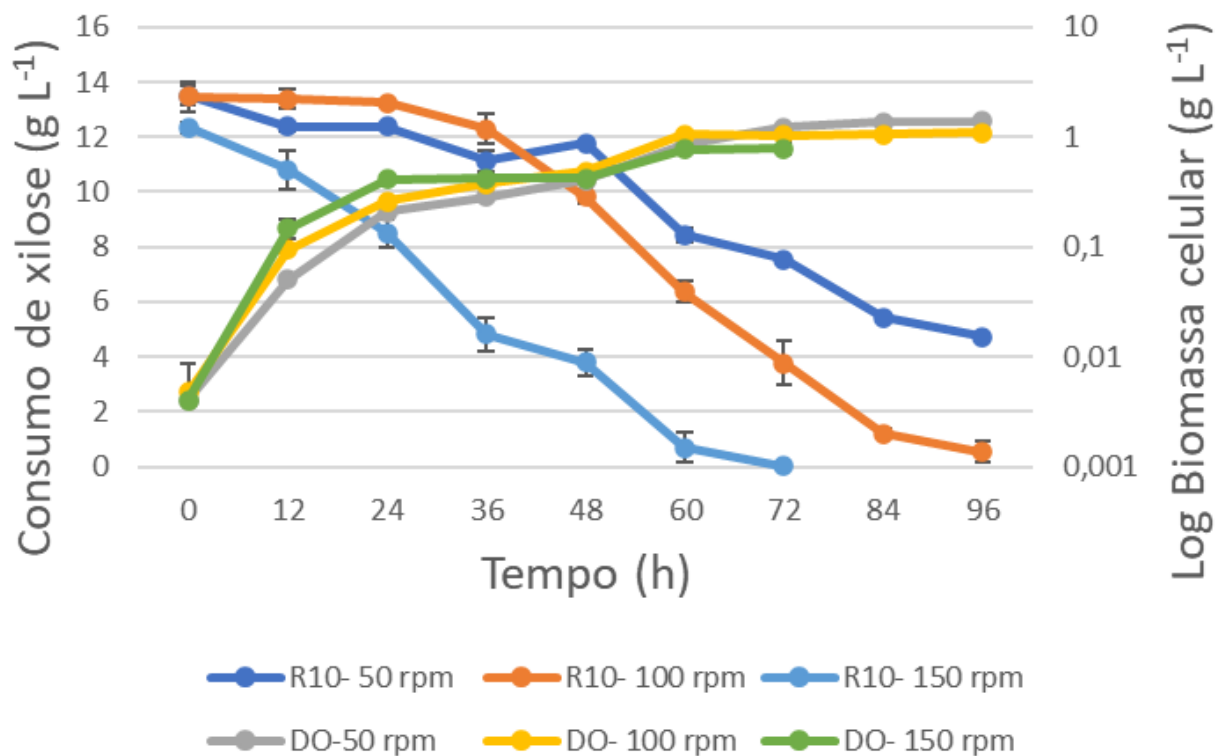
**Tabela 16:** Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G, conduzidos nas temperaturas 28°C e diferentes velocidades de agitação.

Velocidade de agitação	Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)	Y <sub>X/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	TEMPO (h)	Y <sub>P/S</sub> (gg <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)
	Etanol	Etanol	Etanol	Biomassa		Xilitol	Xilitol	Xilitol
50 rpm	-	-	-	0,106	96,00	-	-	-
100 rpm	0,38	0,05	41,99	0,085	96,00	-	-	-
150 rpm	-	-	-	0,102	72,00	0,20	-	-

Y<sub>P/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a álcool; Y<sub>X/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a biomassa celular; Q<sub>P</sub> (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>): Produtividade volumétrica de etanol; Ef (%): eficiência da fermentação alcoólica.

Fonte: AUTOR

Na Figura 21 encontra-se apresentada a cinética fermentativa da linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 em meio YEPMX conduzida a 28°C nas velocidades de agitação 50, 100 e 150 rpm quanto ao consumo de açúcar e crescimento celular.



Fonte: AUTOR

**Figura 21:** Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 conduzida a 28°C nas velocidades de agitação de 150 rpm, 100 rpm e 50 rpm.

Na velocidade de 50 rpm, a levedura *G. geotrichum* não consumiu a xilose totalmente, apresentando remanescente  $5,64 \pm 0,18$  g L<sup>-1</sup> desse açúcar no meio fermentativo, após 96 horas (Tabela 17). Nessa mesma condição, a linhagem não produziu etanol e ou xilitol, podendo a fonte de carbono ter sido utilizada para a manutenção celular, pois a levedura obteve rendimento de  $Y_{X/S} = 0,198$  g g<sup>-1</sup> de biomassa celular (Tabela 18). No ensaio fermentativo utilizando a velocidade de 150 rpm, essa levedura também não produziu etanol, contudo foi capaz de consumir toda a xilose como fonte de carbono, podendo também ter usado a xilose para o seu crescimento, pois a levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 obteve um rendimento de biomassa celular de  $Y_{X/S} = 0,158$  g g<sup>-1</sup>.

**Tabela 17:** Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 conduzidos a 28°C e diferentes velocidades de agitação por 72 e 96 h.

PRODUTOS (g L <sup>-1</sup> )	Velocidade de agitação		
	50 rpm	100 rpm	150 rpm
Xilose	5,64±0,18	ND	ND
Etanol	ND	5,42±0,19	ND
Ácido acético	ND	0,92±0,08	ND
Xilitol	ND	ND	ND

ND= Não detectado

Fonte: AUTOR

**Tabela 18:** Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, conduzidos nas temperaturas 28°C e diferentes velocidades de agitação.

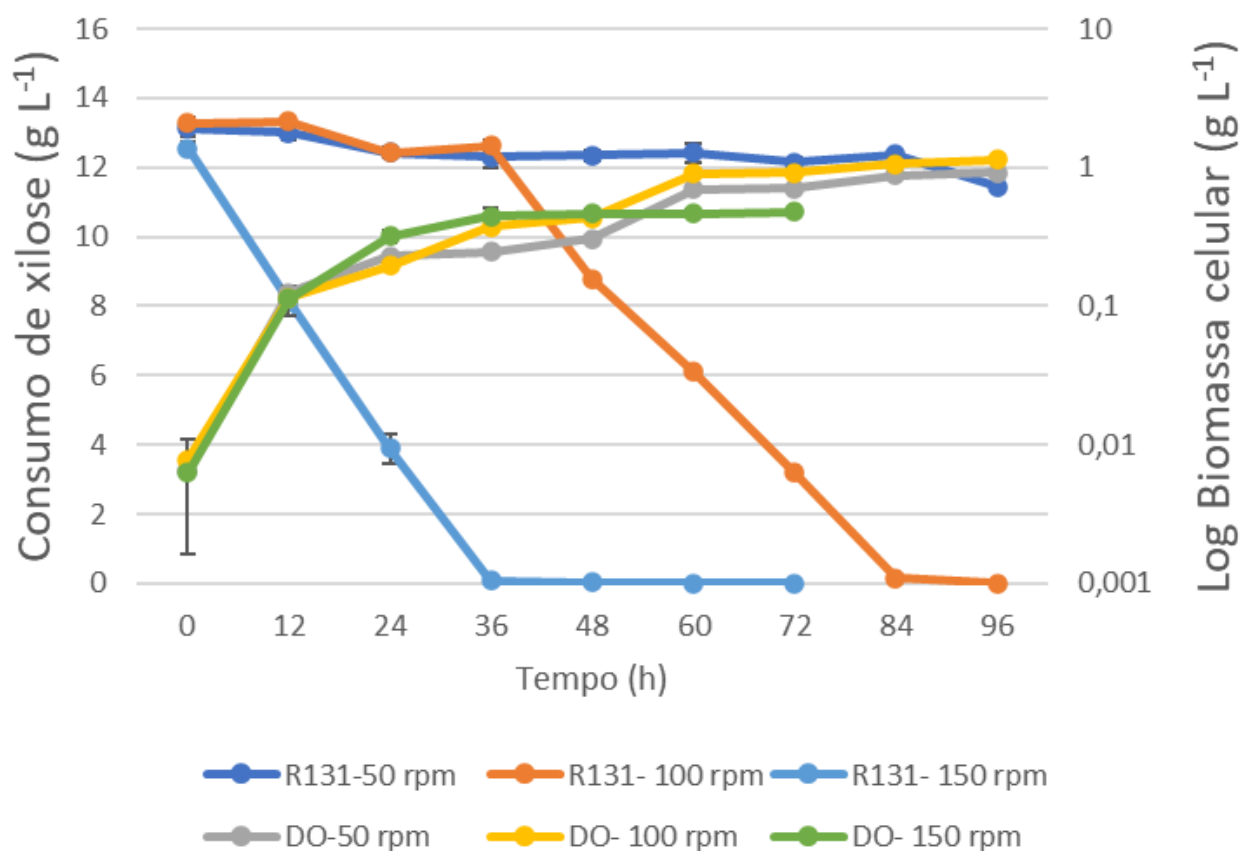
Velocidade de agitação	Y <sub>P/S</sub> (gg <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)	Y <sub>X/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	TEMPO (h)	Y <sub>P/S</sub> (gg <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)
	Etanol	Etanol	Etanol	Biomassa		Xilitol	Xilitol	Xilitol
50 rpm	-	-	-	0,198	96,00	-	-	-
100 rpm	0,48	0,06	52,53	0,086	96,00	-	-	-
150 rpm	-	-	-	0,158	72,00	-	-	-

Y<sub>P/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a álcool; Y<sub>X/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a biomassa celular; Q<sub>P</sub> (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>): Produtividade volumétrica de etanol; Ef (%): eficiência da fermentação alcoólica.

Fonte: AUTOR

No ensaio fermentativo empregando a velocidade de agitação de 100 rpm, a linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 consumiu a xilose totalmente produzindo 5,42±0,19 g L<sup>-1</sup> de etanol, com um rendimento de Y<sub>P/S</sub> 0,48 g g<sup>-1</sup>, taxa de produtividade de 0,06 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e 52,53% de eficiência fermentativa, conforme descrito na Tabela 20. Nos estudos realizados por Valinhas (2017) a linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 obteve um rendimento de etanol de Y<sub>P/S</sub> 0,35 g g<sup>-1</sup>, conduzida a 28°C por 96 h, sob agitação de 150 rpm e no meio YEPMG. Conforme discutido anteriormente, as fontes de carbono influenciaram de forma direta a produção de etanol pelas leveduras estudadas, podendo ser a resposta para o aumento do rendimento final (0,48 g g<sup>-1</sup>) obtido nesse ensaio. Outra hipótese é a influência direta da velocidade de agitação na produção do etanol, pois segundo Barbosa (2017), a levedura *Galactomyces geotrichum* produziu 0,27 g g<sup>-1</sup> e taxa de produtividade de 0,01 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> em meio sintético suplementado de nutrientes, conforme descrito por Oliveira (2010) a 150 rpm. De acordo com os resultados encontrados por esses autores, além de corroborar com a influência das fontes de carbono, este estudo indica que utilizando a velocidade de agitação de 150 rpm, o rendimento final de 0,27 g g<sup>-1</sup> de etanol é menor do que o rendimento de etanol encontrado na velocidade de 100 rpm (0,48 g g<sup>-1</sup>).

A cinética fermentativa da linhagem *Candida akabanensis* UFVJM-R131 no meio YEPX com pH 5.2 conduzida a 28°C nas velocidades de agitação 50, 100 e 150 rpm, se encontra descrita na Figura 22. O consumo de açúcar e o crescimento celular desempenhado por essa levedura se mostra diferente à medida que as velocidades de agitação são alteradas. Na velocidade de 50 rpm, a *Candida akabanensis* UFVJM-R131 não consumiu a fonte de carbono presente no meio fermentativo, restando 11,23±0,34 g L<sup>-1</sup> de xilose, conforme descrito na Tabela 19. Provavelmente a linhagem de levedura utilizou a pequena parte consumida xilose para manutenção celular, devido ao rendimento de  $Y_{X/S} = 0,027$  g g<sup>-1</sup> de biomassa celular, conforme apresentado na Tabela 10.



Fonte: AUTOR

**Figura 22:** Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131 conduzida a 28°C nas velocidades de agitação de 150 rpm, 100 rpm e 50 rpm.

A linhagem *Candida akabanensis* UFVJM-R131, no ensaio fermentativo utilizando a velocidade de agitação de 100 rpm, consumiu totalmente a xilose como fonte de carbono e ainda, produziu 6,08±0,88 g L<sup>-1</sup> de etanol (Tabela 19), com rendimento de  $Y_{P/S} 0,49$  g g<sup>-1</sup>, taxa de produtividade de 0,06 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e 53,50% de eficiência fermentativa, conforme descrito na Tabela 20. No ensaio fermentativo utilizando a velocidade de agitação de 150 rpm, essa levedura produziu

5,22±0,65g L<sup>-1</sup> de etanol, com rendimento de 0,42 g g<sup>-1</sup>, eficiência fermentativa de 45,89% e taxa de produtividade de 0,05 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, por um tempo de 72 h e 28°C, conforme demonstrado na Tabela 20.

**Tabela 19:** Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPXM utilizando a linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131 conduzidos a 28°C e diferentes velocidades de agitação por 72 e 96 h.

PRODUTOS (g L <sup>-1</sup> )	Velocidade de agitação		
	50 rpm	100 rpm	150 rpm
Xilose	11,23±0,34	ND	ND
Etanol	ND	6,08±0,88	5,22±0,65
Ácido acético	ND	ND	ND
Xilitol	ND	ND	ND

ND= Não detectado

Fonte: AUTOR

Os resultados encontrados nesse ensaio demonstram a influência direta da velocidade de agitação no desempenho das linhagens *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, *Candida akabanensis* UFVJM-R131, *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G na produção de etanol. O rendimento de etanol de Yp/s 0,49 g g<sup>-1</sup> obtido pela linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131 nesse estudo quando comparado aos rendimentos de etanol de Yp/s 0,47 g g<sup>-1</sup> e Yp/s 0,40 g g<sup>-1</sup>, alcançando pela levedura *Pichia stipitis* (OLIVEIRA, 2010; SILVA *et al.*, 2012), hoje conhecida como *Scheffersomyces spitis* reportada na literatura como uma das melhores fermentadoras de pentose (AGBOGBO *et al.*, 2006; MATEO *et al.*, 2015; GUPTA, VERMA, 2015), torna a *C. akabanensis* UFVJM-R131 uma linhagem de levedura promissora para a produção de etanol lignocelulósico, nas condições operacionais estudadas.

**Tabela 20:** Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131, conduzidos nas temperaturas 28°C e diferentes velocidades de agitação.

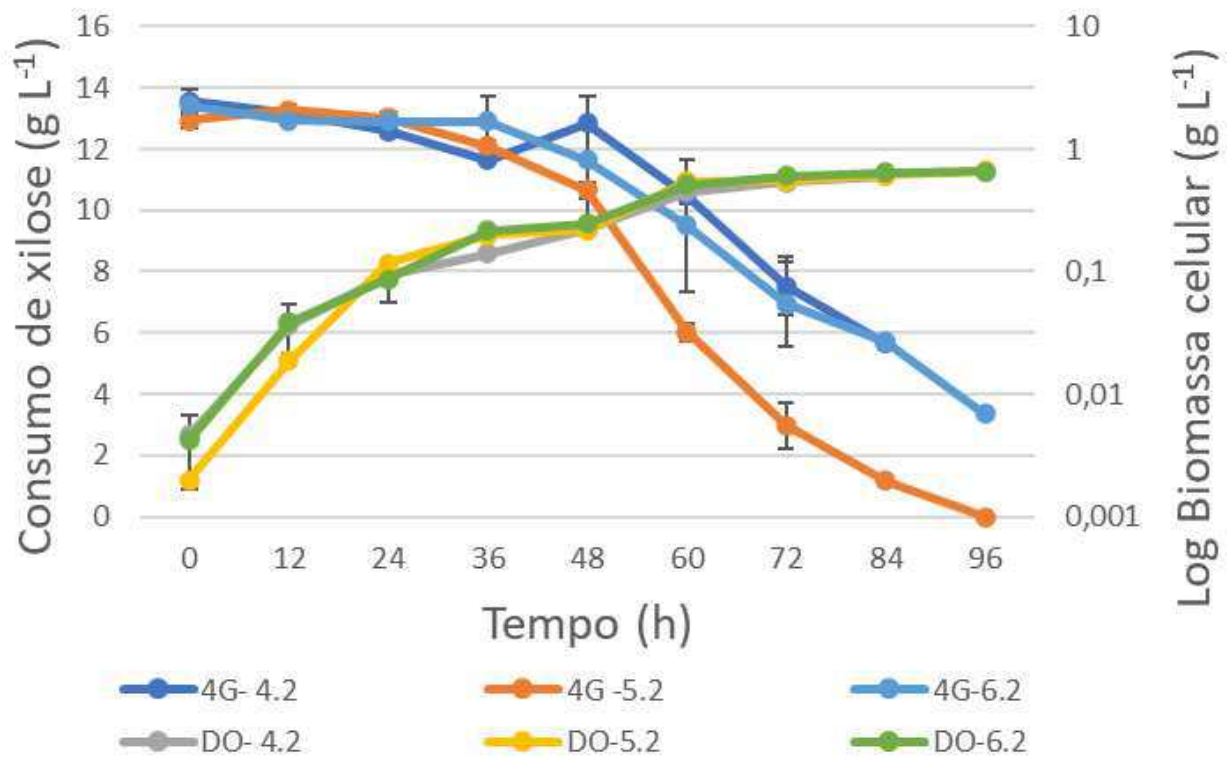
Velocidade de agitação	Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)	Y <sub>X/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	TEMPO (h)	Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)
	Etanol	Etanol	Etanol	Biomassa		Xilitol	Xilitol	Xilitol
50 rpm	-	-	-	0,027	96,00	-	-	-
100 rpm	0,49 <sup>a</sup>	0,06 <sup>a</sup>	53,50 <sup>a</sup>	0,062	96,00	-	-	-
150 rpm	0,42 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	45,89 <sup>b</sup>	0,096	72,00	-	-	-

Y<sub>P/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a álcool; Y<sub>X/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a biomassa celular; Q<sub>P</sub> (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>): Produtividade volumétrica de etanol; Ef (%): eficiência da fermentação alcoólica. Valores nas colunas (médias) seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a p>0,05.

Fonte: AUTOR

### 5.3.3.3 Investigação da pH

O pH é outro parâmetro importante que pode afetar a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos (MATSUSHIKA, SAWAYAMA; 2012). Esses autores também relataram que em baixo pH, como resultado do aumento do gradiente de prótons através da membrana plasmática, pode ocorrer a inibição do crescimento microbiano, bem como pode afetar a viabilidade celular. Visando nessas alterações, bem como nos resultados obtidos dos ensaios fermentativos de temperatura e velocidade de agitação, despertou a curiosidade em conhecer o desempenho das leveduras *Galactomyces geotrichum*, *Candida akabanensis*, *Candida orthopsilosis* nos meios YEPMX com os pH 4.2 e pH 6.2.



Fonte: AUTOR

**Figura 23:** Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G conduzida a 28°C, 100 rpm nos pH 4.2, 5.2 e 6.2

A cinética fermentativa da linhagem *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G conduzida a 28°C, 100 rpm nos diferentes pH, está representada na Figura 23. No ensaio fermentativo com pH 4.2, a linhagem *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G não consumiu totalmente a xilose, restando uma concentração de  $4,74 \pm 0,98$  g L<sup>-1</sup> no meio fermentativo após 96 h (Tabela 21). Nesse mesmo pH, a levedura não produziu etanol, todavia produziu  $0,69 \pm 0,04$  g L<sup>-1</sup> de xilitol, com rendimento de 0,09



g g<sup>-1</sup>, bem como realizou a manutenção da biomassa celular com rendimento de 0,147 g g<sup>-1</sup> (Tabela 22). No ensaio fermentativo com o pH de 6.2, a linhagem *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G também não consumiu totalmente a xilose, restando 3,91±1,90 g L<sup>-1</sup> desse açúcar no meio fermentativo, conforme apresentado na Tabela 21. Nessas mesmas condições, a linhagem não produziu etanol, contudo produziu 0,91±0,02 g L<sup>-1</sup> de xilitol com rendimento de 0,11 g g<sup>-1</sup> e biomassa celular com rendimento de 0,080 g g<sup>-1</sup>. Os resultados desse ensaio fermentativo demonstram que alterando o pH do meio de cultivo, a linhagem *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G desempenha comportamentos distintos ao consumo de açúcar, bem como a produção de metabólitos, apresentando a melhor condição experimental para produção de etanol, para esta levedura, o meio de cultivo com pH de 5.2, pois obteve um rendimento de Y<sub>P/S</sub> 0,38 g g<sup>-1</sup> de etanol, após 96 h.

**Tabela 21:** Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEP MX utilizando a linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G conduzidos por 100 rpm a 28°C nos diversos pH e 96 h.

PRODUTOS (g L <sup>-1</sup> )	pH		
	4.2	5.2	6.2
Xilose	4,74±0,98	0,75±0,17	3,91±1,90
Etanol	ND	4,63±0,07	ND
Ácido acético	ND	ND	ND
Xilitol	0,69±0,04	ND	0,91±0,02

ND= Não detectado

Fonte: AUTOR

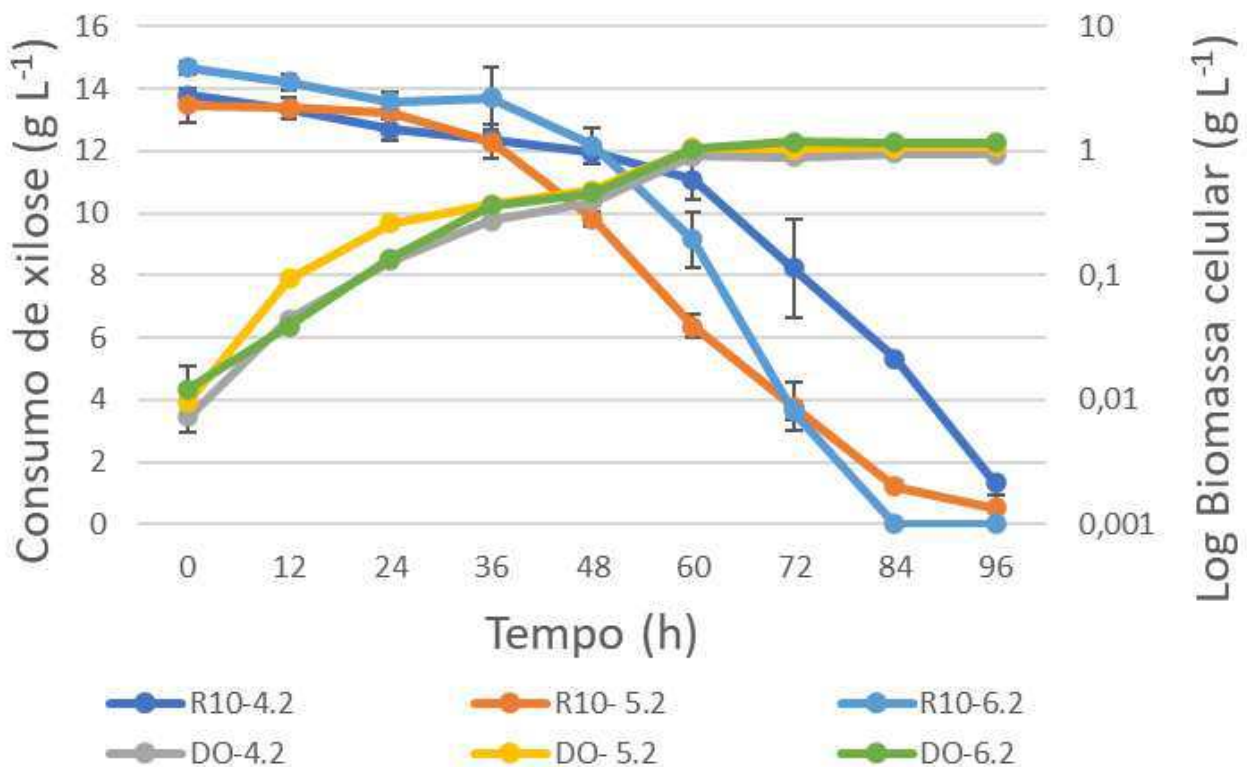
**Tabela 22:** Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G, conduzidos por 100 rpm a 28°C nos diversos pH.

pH	Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)	Y <sub>X/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	TEMPO (h)	Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)
	Etanol	Etanol	Etanol	Biomassa		Xilitol	Xilitol	Xilitol
4.2	-	-	-	0,147	96	0,09	-	-
5.2	0,38	0,05	41,99	0,085	96	-	-	-
6.2	-	-	-	0,080	96	0,11	-	-

Y<sub>P/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a álcool; Y<sub>X/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a biomassa celular; Q<sub>P</sub> (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>): Produtividade volumétrica de etanol; Ef (%): eficiência da fermentação alcoólica.

Fonte: AUTOR

Na Figura 24 encontra-se descrita a cinética fermentativa da linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 conduzida a 28°C por 100 rpm, onde observa diferença no consumo de açúcar e o crescimento celular desempenhado por essa levedura nos diferentes pH.



Fonte: AUTOR

**Figura 24:** Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 conduzida a 28°C, 100 rpm nos pH 4.2, 5.2 e 6.2.

No ensaio fermentativo utilizando meio sintético YEPMX com o pH de 4.2, por 100 rpm a 28 °C, a linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 não consumiu totalmente a fonte de carbono, restando a concentração de  $1,33 \pm 1,24 \text{ g L}^{-1}$  de xilose ao final do processo, conduzido por 96 h (Tabela 23). Nessas mesmas condições essa levedura produziu  $5,17 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$  de etanol, com rendimento de  $0,48 \text{ g g}^{-1}$ , taxa de produtividade de  $0,05 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$  e 52,71% de eficiência fermentativa, conforme apresentado na Tabela 24. A linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, nessas mesmas condições experimentais, também produziu  $0,23 \pm 0,16 \text{ g g}^{-1}$  de xilitol, com rendimento  $0,02 \text{ g g}^{-1}$ . Portanto, a alteração do pH 5.2 do meio de cultivo YEPMX para o pH de 4.2, a linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 difere no seu comportamento de consumo de açúcar, bem como na produtividade do álcool, sendo ainda, o melhor comportamento até o momento no pH 5.2, com rendimento em etanol de  $0,48 \text{ g g}^{-1}$ .

**Tabela 23:** Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 conduzidos por 100 rpm a 28°C nos diversos pH e 96 h.

PRODUTOS (g L <sup>-1</sup> )	pH
-------------------------------	----

	4.2	5.2	6.2
<b>Xilose</b>	1,33±1,24	ND	0,81±0,05
<b>Etanol</b>	5,17±0,26	5,42±0,19	5,74±0,1
<b>Ácido acético</b>	ND	ND	0,92±0,08
<b>Xilitol</b>	0,23±0,16	ND	ND

ND= Não detectado

Fonte: AUTOR

No ensaio fermentativo utilizando o pH 6.2, a linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 produziu 5,74±0,1 g L<sup>-1</sup> de etanol, com rendimento de 0,42 g g<sup>-1</sup>, taxa de produtividade de 0,05 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e 46,11% de eficiência fermentativa conduzidos por um tempo de 96 h, conforme descrito na Tabela 24. Nessas mesmas condições a levedura produziu ainda, 0,92±0,08 g L<sup>-1</sup> de ácido acético e biomassa celular com rendimento de 0,136 g g<sup>-1</sup> (Tabela 4). Conforme discutido anteriormente, a linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 obteve um melhor desempenho para a produção de etanol no o pH 5.2, pois apresentou um rendimento de Y<sub>P/S</sub> 0,48 g g<sup>-1</sup> de etanol.

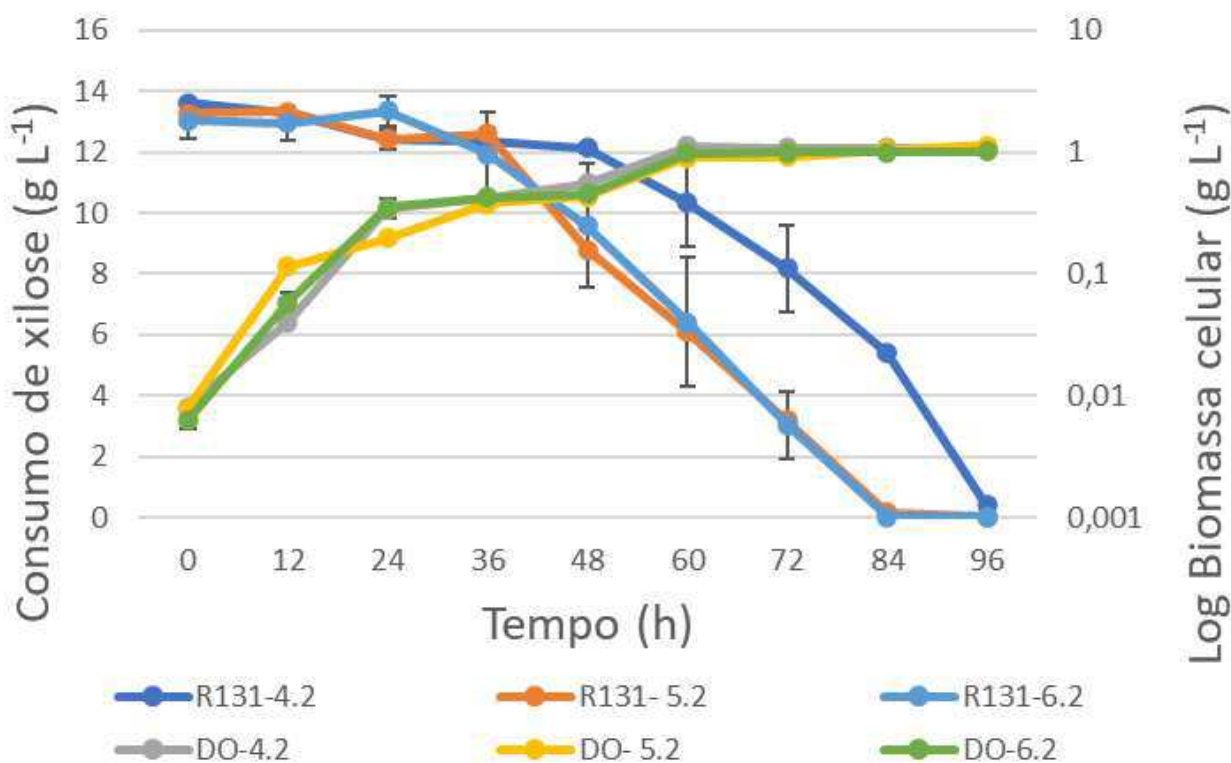
**Tabela 24:** Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, conduzidos por 100 rpm a 28°C nos diversos pH.

pH	Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)	Y <sub>X/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	TEMPO (h)	Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)
	Etanol	Etanol	Etanol	Biomassa		Xilitol	Xilitol	Xilitol
4.2	0,48 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	52,71 <sup>a</sup>	0,136	96	0,02	-	-
5.2	0,48 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b</sup>	52,53 <sup>b</sup>	0,086	96	-	-	-
6.2	0,42 <sup>b</sup>	0,05 <sup>a</sup>	46,11 <sup>c</sup>	0,092	96	-	-	-

Y<sub>P/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a álcool; Y<sub>X/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a biomassa celular; Q<sub>P</sub> (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>): Produtividade volumétrica de etanol; Ef (%): eficiência da fermentação alcoólica. Valores nas colunas (médias) seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a  $p > 0,05$ .

Fonte: AUTOR

A cinética fermentativa da linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131, representada na Figura 25, se comportou diferente quanto ao consumo de açúcar e crescimento celular conduzida por 100 rpm a 28°C nos pH de 4.2, 5.2 e 6.2.



Fonte: AUTOR

**Figura 25:** Cinética da fermentação utilizando a linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131 conduzida a 28°C, 100 rpm nos pH 4.2, 5.2 e 6.2.

O ensaio fermentativo utilizando o meio YEPMX com o pH de 4.2, conduzido por 100 rpm a 28°C, a linhagem *Candida akabanensis* UFVJM-R131 foi capaz de consumir a xilose presente no meio fermentativo, restando  $0,44 \pm 0,62$  g L<sup>-1</sup> desse açúcar, conforme a Tabela 25. Nessas mesmas condições experimentais, essa linhagem de levedura produziu  $2,79 \pm 0,26$  g L<sup>-1</sup> de etanol, com rendimento de  $0,16$  g g<sup>-1</sup>, taxa de produtividade de  $0,02$  g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e 17,95% de eficiência fermentativa conduzidos por um tempo de 96 h (Tabela 26).

**Tabela 25:** Produtos obtidos ao final do processo fermentativo em meio YEPMX utilizando a linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131 conduzidos por 100 rpm a 28°C nos diversos pH e 96 h.

PRODUTOS (g L <sup>-1</sup> )	pH		
	4.2	5.2	6.2
Xilose	$0,44 \pm 0,62$	ND	ND
Etanol	$2,79 \pm 0,26$	$6,08 \pm 0,88$	$6,31 \pm 0,61$
Ácido acético	ND	ND	$1,01 \pm 0,07$
Xilitol	ND	ND	ND

ND= Não detectado  
Fonte: AUTOR

No ensaio fermentativo utilizando o meio de cultivo com pH de 6.2, a levedura *Candida akabanensis* consumiu totalmente a xilose dissolvida no meio fermentativo e ainda foi capaz de produzir  $6,31 \pm 0,61 \text{ g L}^{-1}$  de etanol, com rendimento de  $0,50 \text{ g g}^{-1}$ , taxa de produtividade de  $0,07 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$  e 55,47% de eficiência fermentativa por um tempo de 96 h (Tabela 26). Nessas mesmas condições experimentais, esta linhagem produziu ainda,  $1,01 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$  de ácido acético e biomassa celular com rendimento de  $0,005 \text{ g g}^{-1}$ . Como discutido anteriormente, a alteração do pH no meio de cultivo, influência de forma direta no consumo de açúcar e na produção de etanol, bem como em outros metabólitos. Observando a Tabela 26, estatisticamente para a linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131 o melhor desempenho para produção de álcool foi no pH de 6.2, onde obteve um rendimento de  $Y_{P/S} 0,50 \text{ g g}^{-1}$ .

**Tabela 26:** Resultados dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131, conduzidos por 100 rpm a 28°C nos diversos pH.

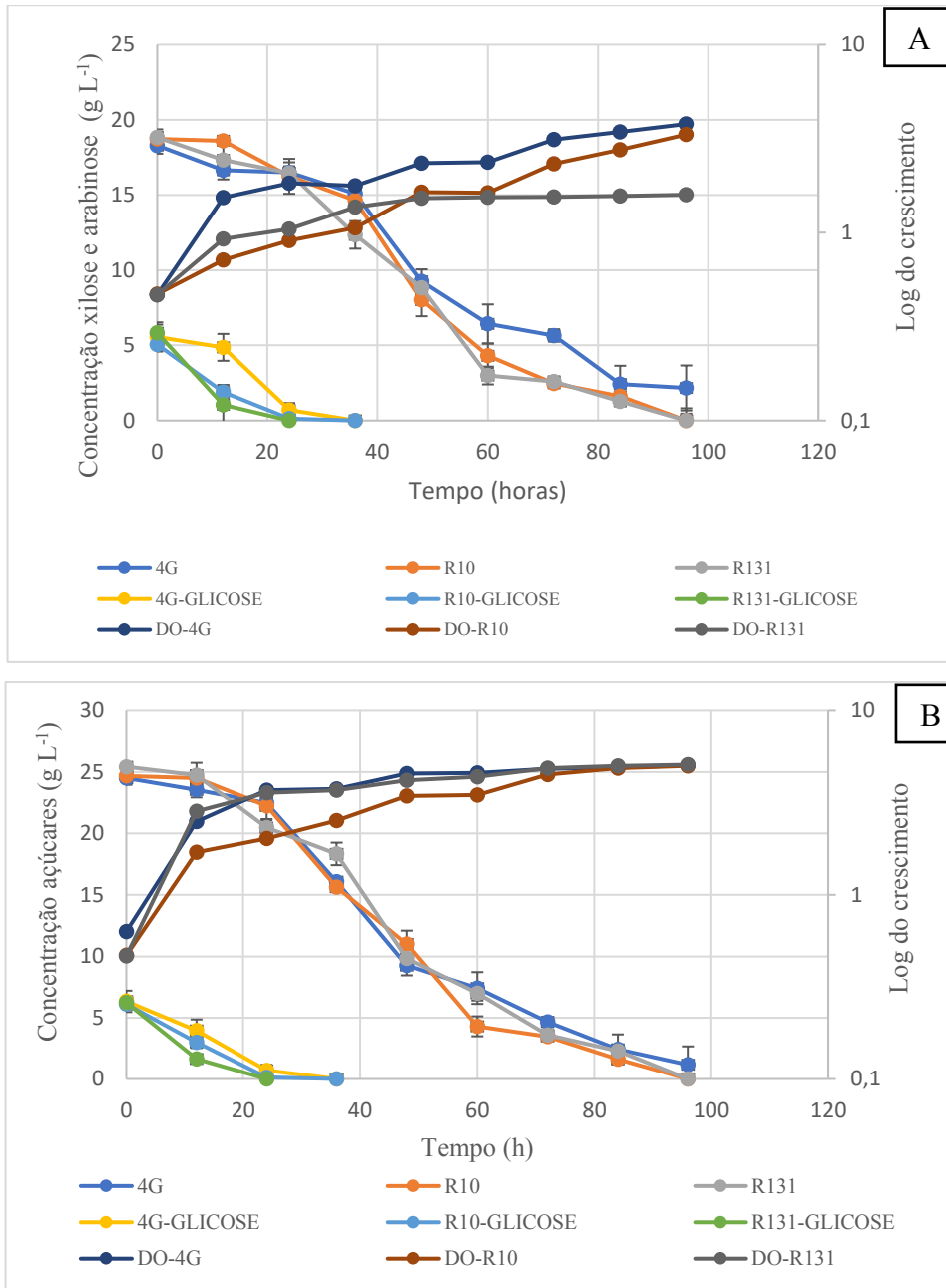
pH	$Y_{P/S} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	$Q_P \text{ (g L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)}$	Ef (%)	$Y_{X/S} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	TEMPO (h)	$Y_{P/S} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	$Q_P \text{ (g L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)}$	Ef (%)
	Etanol	Etanol	Etanol	Biomassa		Xilitol	Xilitol	Xilitol
4.2	0,16 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	17,95 <sup>a</sup>	0,933	96	-	-	-
5.2	0,49 <sup>b</sup>	0,06 <sup>b</sup>	53,50 <sup>b</sup>	0,062	96	-	-	-
6.2	0,50 <sup>c</sup>	0,07 <sup>c</sup>	55,47 <sup>c</sup>	0,055	96	-	-	-

$Y_{P/S} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$ : rendimento da conversão dos açúcares a álcool;  $Y_{X/S} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$ : rendimento da conversão dos açúcares a biomassa celular;  $Q_P \text{ (g L}^{-1}\text{ h}^{-1}\text{)}$ : Produtividade volumétrica de etanol; Ef (%): eficiência da fermentação alcoólica. Valores nas colunas (médias) seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a  $p > 0,05$ .

**Fonte:** AUTOR

Os ensaios fermentativos realizados nesse trabalho foram importantes para otimizar as melhores condições experimentais para a produção de etanol, utilizando como fonte de carboidrato a xilose. A *Candida akabanensis* UFVJM-R131, alterando o pH do meio de cultivo YEP MX para 6.2, a temperatura de 28°C e velocidade de agitação 100 rpm, foi capaz de produzir etanol em rendimentos significativos ( $0,50 \text{ g g}^{-1}$ ). Conforme a literatura, esse rendimento é promissor, pois de acordo com YU *et al.* (2015), a espécie *Scheffersomyces stipitis* por possuir dois sistemas enzimáticos capazes de favorecer a via metabólica pentoses fosfato para produção de álcool, conseguiu atingir consideráveis rendimentos de etanol, de  $0,49 \text{ g g}^{-1}$  e Cadete *et al.* (2012) em seus estudos, demonstraram que a espécie *Spathaspora passalidarum* foi capaz de converter xilose a etanol a rendimentos de  $0,37 \text{ g g}^{-1}$ .

## 5.4 Processo Fermentativo



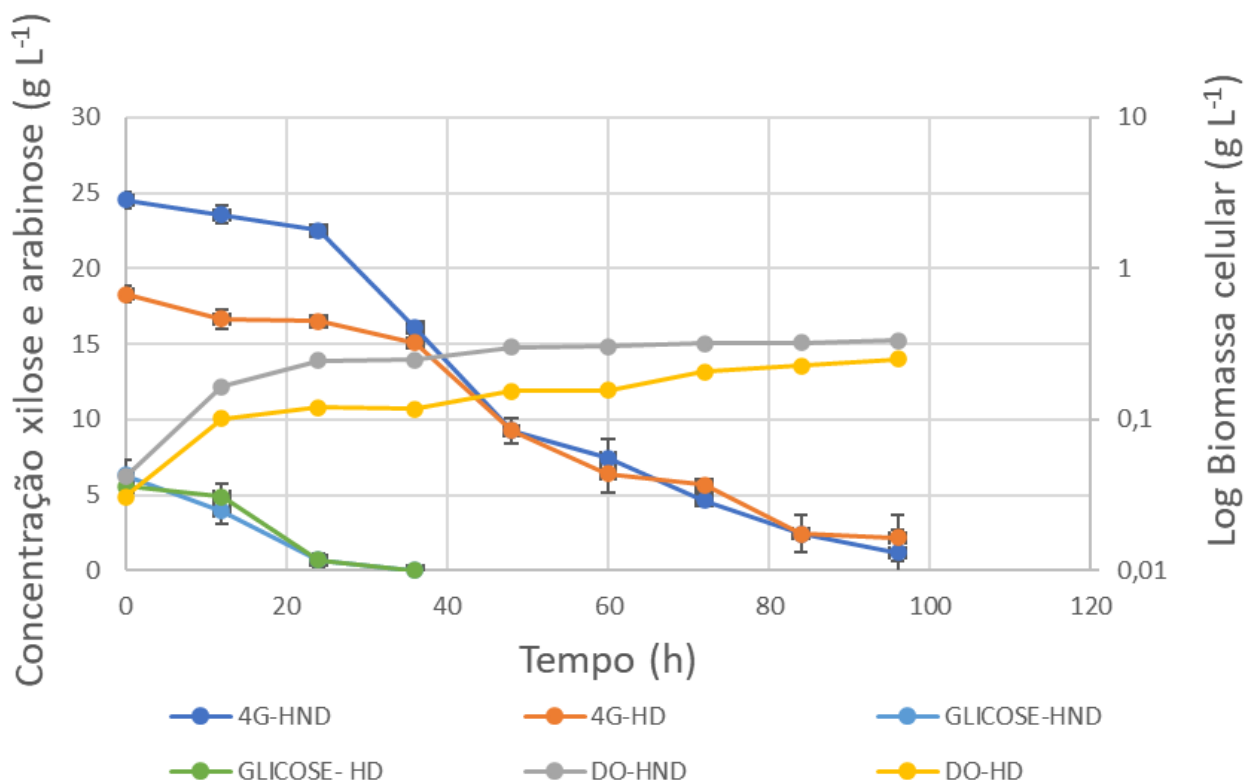
Fonte: AUTOR

**Figura 26:** Cinética dos processos fermentativos utilizando as linhagens de leveduras nos hidrolisados com o pH 6.2: A) destoxificado e B) não destoxificado conduzida a 28°C e 100 rpm.

O presente ensaio fermentativo objetiva conhecer o comportamento das linhagens de leveduras *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G e *Candida akabanensis* UFVJM-R131 no hidrolisado de caroço de algodão. Visando minimizar os efeitos inibitórios, bem como aumentar a produção de etanol, foi realizado a etapa de destoxificação desse hidrolisado utilizando carvão ativado a 5%. Esse estudo ainda, foi realizado nas melhores condições encontradas nos ensaios fermentativos sintéticos anteriores, sendo então, os próximos ensaios

conduzidos na temperatura a 28°C, velocidade de agitação a 100 rpm e hidrolisados de caroço de algodão destoxificado e não destoxificado com o pH ajustado em 6,2. As cinéticas fermentativas desses ensaios estão descritas na Figura 26.

Na Figura 26 é possível observa que a glicose foi totalmente consumida nas primeiras 20 horas por todas as linhagens de leveduras, mesmo no hidrolisado destoxificado e não destoxificado. Esse comportamento diverge dos estudos de Matos (2018), que segundo esse, as linhagens de leveduras *G. geotrichum* UFVJM-R10 e *C. akabanensis* UFVJM-R131, em hidrolisado ácido de torta de girassol suplementado, conseguiram consumir totalmente a glicose nas primeiras 12 horas, enquanto, em hidrolisado não suplementado, apenas a *C. akabanensis* UFVJM-R131 foi capaz de consumir a glicose nas 12 primeiras horas e a *G. geotrichum* UFVJM-R10, sendo concluído com 60 horas. Silva (2012), em seus estudos com hidrolisado ácido de torta de caroço de algodão destoxificado, observou que a glicose também foi consumida nas primeiras 20 horas, corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho. Os demais açúcares presentes nos hidrolisados estudados, foram consumidos ao longo das 96 h.



Fonte: AUTOR

**Figura 27:** Cinética fermentativas da linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G no hidrolisado ácido de torta de algodão destoxificado e não destoxificado com o pH 6.2 conduzida a 28°C por 100 rpm.

A cinética fermentativa da linhagem *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G no hidrolisado detoxificado e não detoxificado com pH 6.2, a 28°C por 100 rpm se encontra descrita na Figura 27. No hidrolisado lignocelulósico não detoxificado a *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G não consumiu totalmente a xilose presente, restando  $2,04 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$  desse açúcar no meio fermentativo (Tabela 27). Nessas mesmas condições experimentais, essa levedura produziu  $2,98 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$  de etanol, com rendimento de  $Y_{P/S} 0,12 \text{ g g}^{-1}$ , taxa de produtividade de  $0,03 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$  e 13,22% de eficiência fermentativa por um tempo de 96 h, conforme descrito na Tabela 28.

**Tabela 27:** Compostos químicos presentes no hidrolisado ácido hemicelulósico detoxificado e não detoxificado antes e após a fermentação com pH 6.2 utilizando a linhagem de *Candida orthopsilosis* UFVJM-R131 a 28°C por 100 rpm

Produtos da fermentação do hidrolisado ácido de torta de caroço de algodão	<i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G			
	HND		HD	
	Valores iniciais	Valores finais	Valores iniciais	Valores finais
Glicose (g/L)	6,04±0,02	0,38±0,07	4,07±0,18	0,24±0,07
Glicerol (g/L)	2,72±0,30	1,93±0,06	0	0,76±0,03
Ácido acético (g/L)	3,94±0,02	4,10±0,21	3,46±0,143	1,84±0,16
Furfural (g/L)	0	0	0	0
Hemifurfural (g/L)	0,023±0,91	0,001±0,11	0	0
Xilose (g/L)	21,05±0,09	2,04±0,07	18,04±0,498	1,24±0,13
Etanol (g/L)	0	2,98±0,10	0	3,65±0,09
Celbiose (g/L)	0		0	0
Arabinose (g/L)	3,92±0,38	0,66±0,02	0	0

HND=Hidrolisado não detoxificado, HD= Hidrolisado detoxificado

Fonte: AUTOR

No ensaio utilizando o hidrolisado detoxificado, essa levedura produziu  $3,65 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$  de etanol, com rendimento de etanol de  $Y_{P/S} 0,17 \text{ g g}^{-1}$ , taxa de produtividade de  $0,04 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$  e 18,80% de eficiência fermentativa (Tabela 28). Conforme os rendimentos obtidos pela linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G, essa apresentou um melhor desempenho no hidrolisado ácido da torta de caroço de algodão detoxificado ( $Y_{P/S} 0,17 \text{ g g}^{-1}$ ) quando comparado ao hidrolisado não detoxificado ( $Y_{P/S} 0,12 \text{ g g}^{-1}$ ). Esse resultado é promissor para a produção de etanol lignocelulósico utilizando essa levedura, pois segundo Barbosa (2017), utilizando a levedura *Candida orthopsilosis* a 28°C por 150 rpm no meio YEPMG obteve um rendimento de  $Y_{P/S}$  de  $0,20 \text{ g g}^{-1}$  em 89 h para a produção de etanol. Então, mesmo que a levedura nesse presente ensaio tenha obtido um rendimento inferior aos estudos de Barbosa (2017), esse estudo foi realizado em meio sintético, livre de influência dos compostos inibidores. A influência dos compostos inibidores, pode



ainda ser a resposta pelo rendimento maior de 1,40 vezes no hidrolisado destoxificado quando comparado ao hidrolisado não destoxificado.

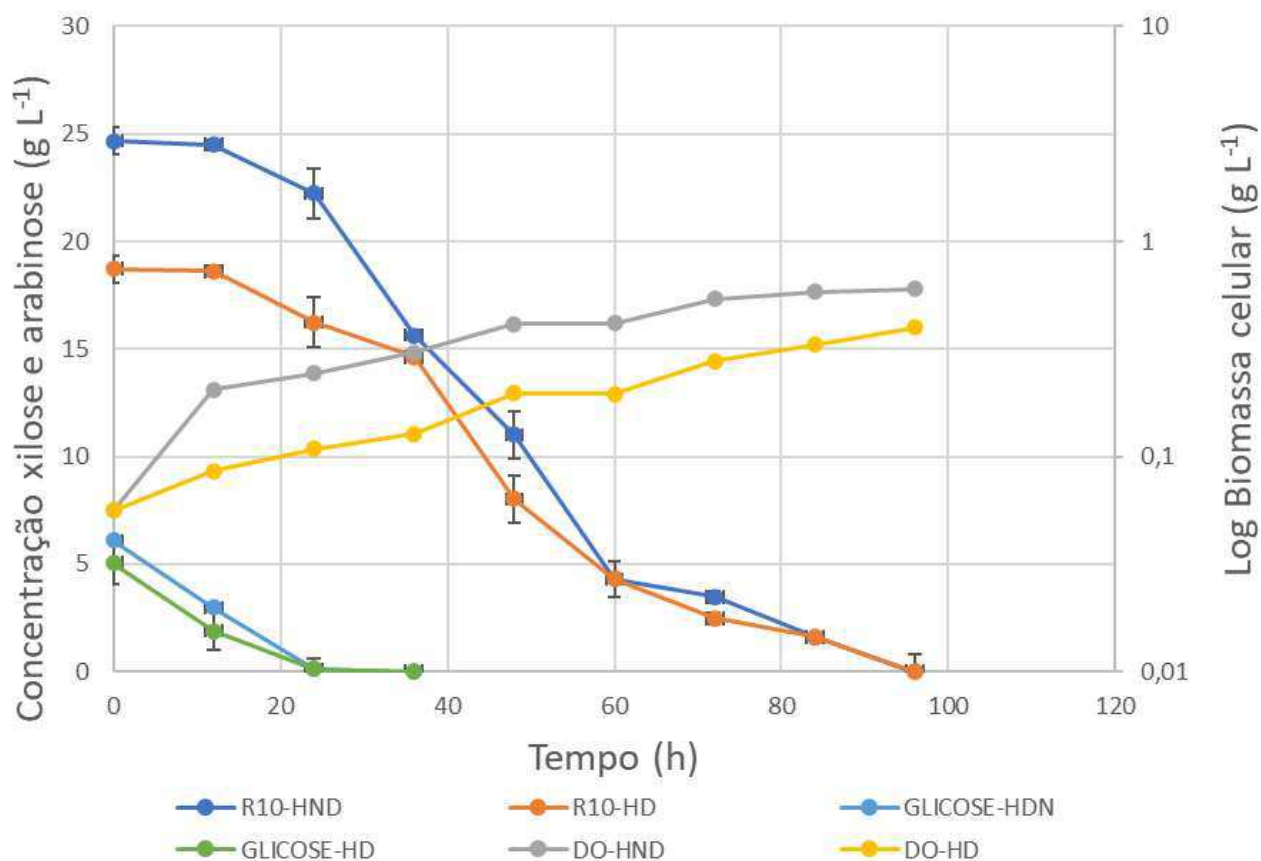
**Tabela 28:** Resultado dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-R131 no hidrolisado lignocelulósico com pH 6.2, a 28°C por 100 rpm.

HIDROLISADO ÁCIDO	Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)
	Etanol	Etanol	Etanol
Hidrolisado destoxificado	0,17 <sup>a</sup>	0,04 <sup>a</sup>	18,80 <sup>a</sup>
Hidrolisado não destoxificado	0,12 <sup>b</sup>	0,03 <sup>b</sup>	13,22 <sup>b</sup>

Y<sub>P/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a álcool; Y<sub>X/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a biomassa celular; Q<sub>P</sub> (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>): Produtividade volumétrica de etanol; Ef (%): eficiência da fermentação alcoólica. Valores nas colunas (médias) seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a  $p > 0,05$ .

Fonte: AUTOR

A cinética fermentativa da linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, no hidrolisado detoxificado e não detoxificado com pH 6.2 conduzida a 28°C por 100 rpm se encontra representada na Figura 28. Nessas condições experimentais a linhagem *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 não consumiu a xilose totalmente presente no hidrolisado ácido não destoxificado, restando 2,13±0,09 g L<sup>-1</sup> desse açúcar, no entanto, essa levedura foi capaz de consumir arabinose e a glicose presente (Tabela 29). Nessas mesmas condições, a linhagem não produziu etanol ou mesmo xilitol, o que pode ser explicado pelos efeitos citotóxicos provenientes das frações sólidas de biomassas lignocelulósico presentes nos hidrolisados após o pre-tratamento ácido. Essa hipótese pode ser comprovada, pois no ensaio utilizando o hidrolisado destoxificado, essa levedura apresentou um comportamento diferente, onde foi capaz de produzir 2,84±0,18 g L<sup>-1</sup> de etanol, com um rendimento de Y<sub>P/S</sub> 0,18 g g<sup>-1</sup>, conforme apresentado na Tabela 30. Segundo Matos (2018), utilizando a *G. geotrichum* UFVJM-R10 em hidrolisado ácido de girassol suplementando apresentou rendimento de Y<sub>P/S</sub> 0,29 g g<sup>-1</sup>, taxa de produtividade de 0,12 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e 56,49% de eficiência fermentativa, conduzido por 48 h. Essa diferença de rendimentos entre os estudos, pode ser justificada, pelo efeito de diauxia realizada por essa levedura, a qual consome todo o etanol produzido, após o esgotamento de todos os monossacarídeos.



Fonte: AUTOR

**Figura 28:** Cinética fermentativa da linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 no hidrolisado ácido de torta de algodão destoxificado e não destoxificado com pH 6.2 conduzida a 28°C e 100 rpm.

**Tabela 29:** Compostos químicos presentes no hidrolisado ácido hemicelulósico destoxificado e não destoxificado antes e após a fermentação com pH 6.2 utilizando a linhagem de *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 a 28°C por 100 rpm.

Produtos da fermentação do hidrolisado ácido de torta de caroço de algodão	<i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10			
	HND		HD	
	Valores iniciais	Valores finais	Valores iniciais	Valores finais
Glicose (g/L)	6,23±0,22	0,47±0,11	4,87±0,03	0,84±0,00
Glicerol (g/L)	2,19±0,03	1,19±0,03	0	0
Ácido acético (g/L)	3,75±0,21	0,97±0,11	3,79±0,14	0
Furfural (g/L)	0	0	0	0
Hemifurfural (g/L)	0,024±0,06	0,003±0,42	0	0
Xilose (g/L)	21,77±0,96	2,13±0,09	18,13±0,49	5,94±2,08
Etanol (g/L)	0	0	0	2,84±0,18
Celobiose (g/L)	0	0	0	0
Arabinose (g/L)	3,95±0,27	0,49±0,01	0	0

HND=Hidrolisado não detoxificado, HD= Hidrolisado destoxificado

Fonte: AUTOR

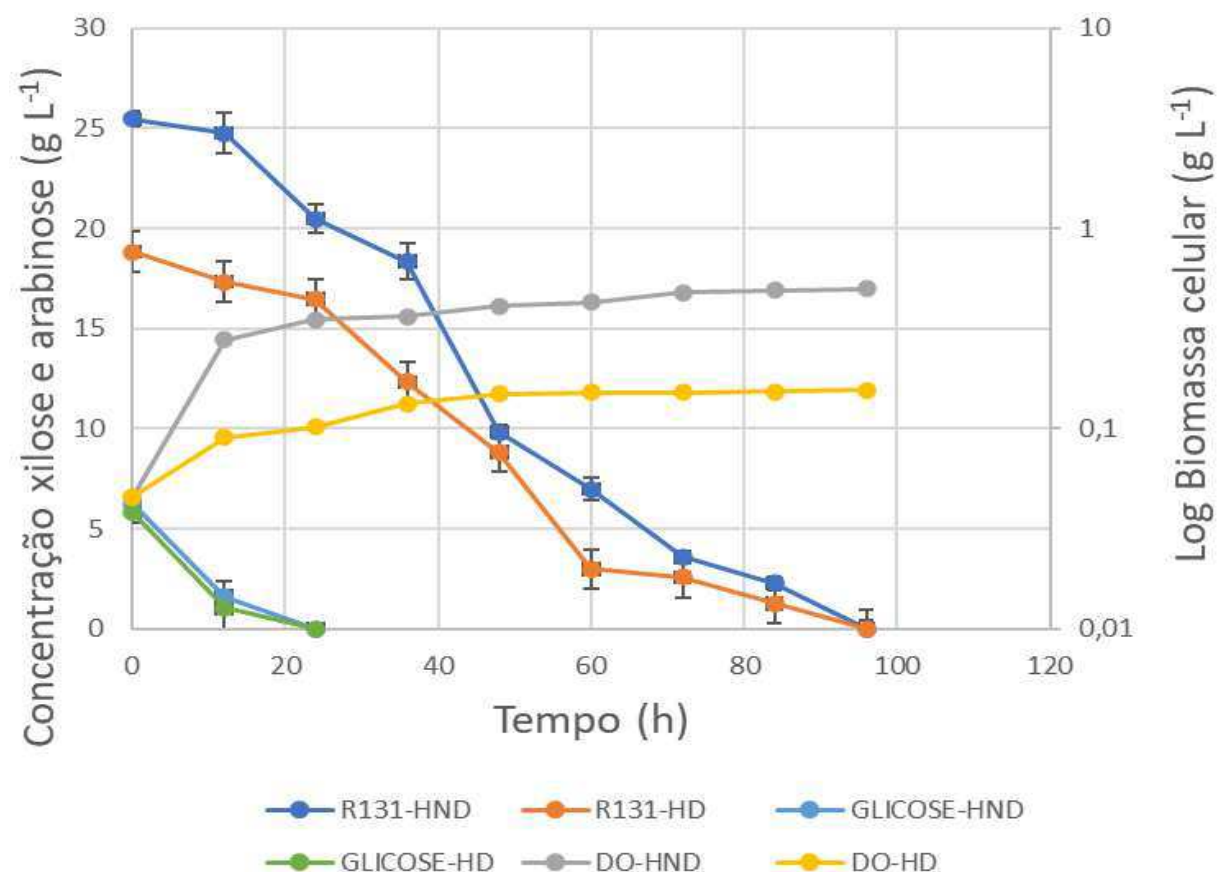
**Tabela 30:** Resultado dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 no hidrolisado lignocelulósico com pH 6.2, a 28°C por 100 rpm.

HIDROLISADO ÁCIDO	Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)
	Etanol	Etanol	Etanol
Hidrolisado destoxificado	0,18 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	19,20 <sup>a</sup>
Hidrolisado não destoxificado	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>

Y<sub>P/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a álcool; Y<sub>X/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a biomassa celular; Q<sub>P</sub> (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>): Produtividade volumétrica de etanol; Ef (%): eficiência da fermentação alcoólica. Valores nas colunas (médias) seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a p>0,05.

Fonte: AUTOR

O perfil cinético fermentativo da linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131 utilizando hidrolisado detoxificado e não detoxificado com pH de 6.2, a 28°C por 100 rpm se encontra apresentado na Figura 29.



Fonte: AUTOR

**Figura 29:** Cinética fermentativa da linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131 no hidrolisado ácido de torta de algodão destoxificado e não destoxificado com o pH 6.2 a 28°C por 100 rpm.

A linhagem *Candida akabanensis* UFVJM-R131 em hidrolisado ácido da torta de caroço de algodão com pH de 6.2 conduzidos a 28°C por 100 rpm, não consumiu totalmente a xilose presente no meio, restando  $2,27 \pm 0,26 \text{ g L}^{-1}$  desse açúcar no hidrolisado ácido não destoxificado, conforme apresentado na Tabela 31. Nessas mesmas condições operacionais a levedura produziu  $2,42 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$  de etanol, com rendimento de  $Y_{P/S} 0,18 \text{ g g}^{-1}$ , taxa de produtividade de  $0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e 9,28 % de eficiência fermentativa, conforme a Tabela 32. Esse resultado, pode ser explicado pelos efeitos citotóxicos provenientes das frações sólidas de biomassas lignocelulósico presentes nos hidrolisados, pois no ensaio utilizando o hidrolisado destoxificado, essa levedura, obteve um desempenho, onde foi capaz de produzir  $4,14 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$  de etanol, com rendimento de  $Y_{P/S} 0,24 \text{ g g}^{-1}$ , taxa de produtividade de  $0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e 25,87% de eficiência fermentativa (Tabela 32).

**Tabela 31:** Compostos químicos presentes no hidrolisado ácido hemicelulósico destoxificado e não destoxificado antes e após a fermentação com pH 6.2 utilizando a linhagem de *Candida akabanensis* UFVJM-R131 a 28°C por 100 rpm.

Produtos da fermentação do hidrolisado ácido de torta de caroço de algodão	<i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131			
	Valores iniciais	Valores Finais	Valores iniciais	Valores Finais
Glicose (g/L)	5,96±0,12	0,34±0,03	4,99±0,18	0,24±0,02
Glicerol (g/L)	2,32±0,03	2,09±0,39	0	0,97±0,02
Ácido acético (g/L)	3,96±0,01	3,92±0,80	3,67±0,143	1,14±0,23
Furfural (g/L)	0		0	0
Hemifurfural (g/L)	0,025±0,19		0	0
Xilose (g/L)	20,98±0,06	2,27±0,26	18,94±0,498	5,72±0,55
Etanol (g/L)	0	2,42±0,08	0	4,14±0,15
Celobiose (g/L)	0		0	0
Arabinose (g/L)	3,89±0,37	0,59±0,08	0	0

Fonte: AUTOR

Matos (2018) estudando essa levedura, em hidrolisado ácido de girassol suplementado, obteve um rendimento de  $0,27 \text{ g g}^{-1}$ . Esse rendimento encontrado por esses autores se encontra superior 1,12 vezes ao encontrado pela linhagem *Candida akabanensis* UFVJM-R131, contudo no presente estudo o hidrolisado não foi suplementado, podendo ser essa a resposta para a diferença entre os rendimentos. Segundo Santos (2012), em estudos com o hidrolisado ácido de torta de algodão utilizando a levedura *Scheffersomyces spitis*, obteve um rendimento de  $Y_{P/S} 0,13 \text{ g g}^{-1}$ , sendo um valor de rendimento inferior ( $0,24 \text{ g g}^{-1}$ ) obtido pela levedura *C. akabanensis*, nas condições operações estudadas no presente trabalho. Nigam (2001) relata que a linhagem de *S. spitis* NRRLY-7124 adaptada em hidrolisado hemicelulósico de madeira de carvalho contendo  $0,27 \text{ g L}^{-1}$

<sup>1</sup> de furfural e 6,90 g L<sup>-1</sup> ácido acético, apresentou rendimento em etanol de 0,27 g g<sup>-1</sup> superior a linhagem não adaptada que obteve um rendimento de 0,15 g g<sup>-1</sup>. Observando esses resultados e o presente ensaio fermentativo utilizando a levedura *Candida akabanensis* selvagem em hidrolisado ácido de torta de caroço de algodão contendo 0,17 g L<sup>-1</sup> de furfural e 2,82 g L<sup>-1</sup> de ácido acético, essa obteve um rendimento em etanol de 0,24 g g<sup>-1</sup>. Isso é um indicativo que esta levedura apresenta maior resistência aos inibidores celulares do que a levedura *Scheffersomyces spitis*.

**Tabela 32:** Resultado dos parâmetros fermentativos obtidos no processo fermentativo utilizando a linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131 no hidrolisado lignocelulósico com pH 6.2, a 28°C por 100 rpm.

HIDROLISADO ÁCIDO	Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Ef (%)
	Etanol	Etanol	Etanol
Hidrolisado destoxificado	0,24 <sup>a</sup>	0,04 <sup>a</sup>	25,87 <sup>a</sup>
Hidrolisado não destoxificado	0,09 <sup>b</sup>	0,03 <sup>b</sup>	9,28 <sup>b</sup>

Y<sub>P/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a álcool; Y<sub>X/S</sub> (g g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a biomassa celular; Q<sub>P</sub> (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>): Produtividade volumétrica de etanol; Ef (%): eficiência da fermentação alcoólica. Valores nas colunas (médias) seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a  $p > 0,05$ .

**Fonte:** AUTOR

O resultado encontrado nos ensaios fermentativos estudados, utilizando temperatura de 28°C por 100 rpm e hidrolisado ácido de torta de caroço de algodão destoxificado com pH de 6.2 se torna promissor para a produção de etanol pela *Candida akabanensis* UFVJM-R131. Conforme reportado anteriormente pelos diversos autores, o ensaio fermentativo utilizando hidrolisado de caroço de algodão sem suplementar com micronutrientes, levedura selvagem, ou seja, levedura não adaptada e ainda, comparando o rendimento de Y<sub>P/S</sub> 0,13 g g<sup>-1</sup> de etanol utilizando o mesmo hidrolisado ácido da torta de caroço de algodão estudado, com a levedura dita a melhor (*Scheffersomyces spitis*) produtora de etanol lignocelulósico, a levedura *Candida akabanensis* obteve um rendimento de etanol significativo (Y<sub>P/S</sub> 0,24 g g<sup>-1</sup>), sendo então promissora para a produção de etanol de segunda geração.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como intuito conhecer o potencial de linhagens fermentadoras de pentoses selvagens utilizando o hidrolisado ácido de torta de algodão na produção de bioetanol. Os ensaios foram montados utilizando triplicadas de hidrolisado ácido não destoxificado e destoxificado com carvão ativado a 5%. Nesse trabalho também foi realizado uma investigação dos melhores parâmetros fermentativos utilizando as linhagens de leveduras *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, *Candida akabanensis* UFVJM-R131 e *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G. Ao final dos ensaios, a linhagem *Candida akabanensis* UFVJM-R131 no hidrolisado ácido de torta de caroço de algodão destoxificado com pH de 6.2 conduzidos a 28°C, 100 rpm obteve o melhor rendimento dentre as demais leveduras, apresentando rendimento de  $Y_{P/S}$  0,24 g g<sup>-1</sup> etanol, taxa de produtividade de 0,04 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e 25,87% de eficiência fermentativa, por um tempo de 96 horas. O resultado encontrado nesse trabalho com a linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R13 se mostra promissor para a melhoria da produção de etanol lignocelulósico. Contudo, é necessário realizar estudos futuros em torno dessa linhagem, pois cada micro-organismo possui características particulares de adaptação ao meio em que se encontra. Portanto, estudos sobre o efeito dos fatores além dos pesquisados aqui, tais como concentração de nutrientes e concentração de massa celular, podem melhorar ainda mais o desempenho dessa levedura ainda pouco conhecida para a produção de etanol lignocelulósico.

## 7 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ANTONOPOULOU, G.; DIMITRELLOS, G.; BEOBIDE, A. S.; VAYENAS, D.; LYBERATOS, G. Chemical pretreatment of sunflower straw biomass: The effect on chemical composition and structural changes. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 5, p. 733-746, 2015.

AGUILAR-REYNOSA, A., ROMANÍ, A., RODRÍGUEZ-JASSO, R.M., AGUILAR, C.N., GARROTE, G., RUIZ, H.A.; Microwave heating processing as alternative of pretreatment in second-generation biorefinery: na overview. **Energy Convers. Manag.**, v.136, p.50-65, 2017.

ALMEIDA JR, BERTILSSON M, GORWA-GRAUSLUND MF, GORSICH S, LIDÉN G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Appl Microbiol Biotechnol**, 82: 625–638, **2009**.

ALEXANDRIDIS, P., GHASEMI, M., FURLANI, E. P., & TSIANOU, M. Solvent processing of cellulose for effective bioresource utilization. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, 14, 40-52, 2018.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key tounlock the future bio-energy: a brief review. *Journal of radiation research and applied sciences*, 7(2), 163-173. **2014**.

BALDWIN, S. A. Membrane transport. **Oxford University Press 2000**.

BARBOSA, G. M. P., Avaliação do potencial de leveduras selvagens para a fermentação alcoólica de D-xilose. **Dissertação de Mestrado**. UFVJM, 2017.

BINOD, P., GNANSOUNOU, E., SINDHU, R., & PANDEY, A. Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, 5, 317-325, 2019.

BETTIGA, M., BENGTSSON, O., HAHN-HAGERDAL, B., GORWA-GRAUSLUND, M.F. Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway. **Microbial Cell Factories**, 8(40). **2009**.

BRAT, D., BOLES, E., WIEDEMANN, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol*, 75, 2304–2311, **2009**.

BRITISH PETROLEUM COMPANY. (1981). **BP statistical review of world energy**. London, British Petroleum Co, 2018.

BRITO, P. L.; DE AZEVEDO FERREIRA, C. M.; SILVA, A. F. F.; PANTOJA, L. DE A.; NELSON, D. L.; DOS SANTOS, A. S.; Hydrolysis, Detoxification and Alcoholic Fermentation of Hemicellulose Fraction from Palm Press Fiber. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, p. 1-12, 2017.

BHERING, L. L.; LAVIOLA, B. G.; MOLINARI, H. B. C. Recursos Genéticos da Macaúba para a produção de óleos e produtos da bioenergia no Brasil. In: II Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos, Brasília - DF. **II Simpósio Brasileiro de Recursos genéticos**, p.386, 2008.

CADETE, R. M., SANTOS, R. O., MELO, M. A., MOURO, A., GONÇALVES, D. L., STAMBUK, B U., ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *FEMS yeast research* 9(8), 1338-1342, 2009.

CADETE, R. M.; ALEJANDRO, M.; SANDSTRÖM, A. G.; FERREIRA, C.; GÍRIO, F.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; ROSA, C. A. FONSECA, C.; Exploring xylose metabolism in *Spathaspora species*: XYL1. 2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n.1, p.167, 2016.

CADETE, R. M., & ROSA, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. **Yeast**, 35(2), 191-199, 2018.

CAMARGO, D.; GOMES, S. D.; FELIPE, M. D. G. D. A.; SENE, L.; Response of by-products of sunflower seed processing to dilute-acid hydrolysis aiming fermentable sugar production. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v.12, n.2, p.239- 246, 2014.

CANILHA, L.; RODRIGUES, R. C. L. B.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S.D. S.; FELIPE, M. D. G. A.; SILVA, S. D. Bioconversion of hemicellulose from sugarcane biomass into sustainable products. Sustainable degradation of lignocellulosic biomass. **Techniques, applications and commercialization**, 15-45. 2013.

CAO, S.; PU, Y.; STUDER, M.; WYMAN, C.; RAGAUSKAS, A. J. Chemical transformations of *Populus trichocarpa* during dilute acid pretreatment. **Rsc Advances**, v. 2, n. 29, p. 10925-10936, 2012.

CARMELO, V.; SANTOS, H.; SÁ-CORREIA, I. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1325, p. 63-70, 1997.

CASEY, E., SEDLAK, M., HO, N. W., MOSIER, N. S. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, 10(4), 385-393, 2010.

CHANDEL, A. K., ANTUNES, F. A., SILVA, M. B., & DA SILVA, S. S. Unraveling the structure of sugarcane bagasse after soaking in concentrated aqueous ammonia (SCAA) and ethanol production by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. **Biotechnology for biofuels**, 6(1), 102, 2013.

CHEN, Y. W.; LEE, H. V. Recent progress in homogeneous Lewis acid catalysts for the transformation of hemicellulose and cellulose into valuable chemicals, fuels, and nanocellulose. **Reviews in Chemical Engineering** 36(2), 215-235, 2020.



CHEN, Z.; WAN, C. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73, 610-621, 2017.

COCAL-ENERGIA RESPONSÁVEL. **Cotações de farelo de macaúba**. 2007. Disponível em: <http://cocal.com.br/produtos/cotações-de-farelo-de-macauba/> Acesso em: 04 junho 2018.

CORDEIRO, A.C.C.; MACIEL, F.C. da S.; ALVES, A.B.; CARVALHO, R. de O.; OLIVEIRA, G.A.; TURCATEL, R.; SILVA, W.L.M. da. Desenvolvimento vegetativo de cultivares de dendezeiro em Roraima no período de 2008 a 2010. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2010. 20p. (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Roraima**, 29). Disponível em: <http://www.cpafr.embrapa.br/publicacoes/index.php/publicacoes/article/viewFile/77/128>. Acesso em: 2 junho 2018.

COSTA, F. F., DE OLIVEIRA, D. T., BRITO, Y. P., DA ROCHA FILHO, G. N., ALVARADO, C. G., BALU, A. M., & DO NASCIMENTO, L. A. S. Lignocellulosics to biofuels: An overview of recent and relevant advances. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, 2020.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Perspectivas para a agropecuária: safra 2020/2021: produtos de verão. Brasília: **Conab**, 2020.

CORTIVO, P. R. D.; Produção de etanol e xilitol por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* e novas espécies de *Spathaspora* a partir de hidrolisados da casca de aveia e soja. **Dissertação (Pós-Graduação em Microbiologia)** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

DA CUNHA-PEREIRA, F., HICKERT, L. R., SEHNEM, N. T., DE SOUZA-CRUZ, P. B., ROSA, C. A., & AYUB, M. A. Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource technology**, 102(5), 4218-4225, 2011.

DEMEKE, M. M., DIETZ, H., LI, Y., FOULQUIÉ-MORENO, M. R., MUTTURI, S., DEPREZ, S., VERPLAETSE, A. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnology for biofuels**, 6(1), 89. 2013.

DIAS, L. M., DOS SANTOS, B. V., ALBUQUERQUE, C. J. B., BAETA, B. E. L., PASQUINI, D., & BAFFI, M. A.; Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*. **Journal of applied microbiology**, v. 124, n.3, p.708-718, 2018.

DIEN, B. S., KURTZMAN, C. P., SAHA, B. C., BOTHAST, R. J. Screening for L-arabinose fermenting yeasts. **Applied biochemistry and biotechnology**. 57(1), 233, 1996.

DOMÍNGUEZ, E.; ROMANÍ, A.; DOMINGUES, L.; GARROTE, G.; Evaluation of strategies for second generation bioethanol production from fast growing biomass *Paulownia* within a biorefinery scheme. **Applied Energy**, v.187, p.777-789, 2017.

DOS SANTOS-ROCHA, M. S. R., DE SOUZA, R. B. A., DA SILVA, G. M., DA CRUZ, A. J. G., & ALMEIDA, R. M. R. G.; Prospecção tecnológica do uso do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração. **Cadernos de Prospecção**, v. 10, n. 3, p. 590, 2017.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F.; Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

DUONG, N. T. T., PRAVEEN, P., & LOH, K. C.; Co-culture of *Zymomonas mobilis* and *Scheffersomyces stipitis* Immobilized in Polymeric membranes for Fermentation of Glucose and Xylose to Ethanol. **Biochemical Engineering Journal**, 2019.

DURÃES, F. O. M.; MAY, A.; PARRELLA, R. da C. Sistema agroindustrial do sorgo sacarino no Brasil e a participação público-privada: oportunidades, perspectivas e desafios. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2012.

EIA. US Energy Information Administration. <http://www.eia.gov>, 2016.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. **Walter de Gruyter**, 2011.

FONSECA C, SPENCER-MARTINS I, HAHN-HÄGERDAL B L-arabinose metabolism in *Candida arabinofermentans* PYCC 5603T and *Pichia guilliermondii* PYCC 3012: influence of sugar and oxygen on product formation. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2007.

GÍRIO, F. M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MARQUES, S., & BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, 101(13), 4775-4800, 2010.

GONZALES, R. R.; SIVAGURUNATHAN, P.; PARTHIBAN, A.; KIM, S. H.; Optimization of substrate concentration of dilute acid hydrolyzate of lignocellulosic biomass in batch hydrogen production. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 22-27, 2016.

GORDOBIL, O.; MORIANA, R.; ZHANG, L.; LABIDI, J.; SEVASTYANOVA, O. Assesment of technical lignins for uses in biofuels and biomaterials: Structure-related properties, proximate analysis and chemical modification. *Industrial crops and products*, 83, 155-165, 2016.

GOTO, M. & KAMIYA, N. Powerful peracetic acid–ionic liquid pretreatment process for the efficient chemical hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 214, p. 487-495, 2016.

GOVINDASWAMY, S. & VANE, L.M. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xilose-fermenting yeast. **Bioresource Technology**, v. 98, p

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current opinion in chemical biology**, 10(2), 141-146. 2006

HAHN-HAGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 74, n. 5, p. 937-53, Apr 2007.

HARMSSEN, P. F. H., HUIJGEN, W., BERMUDEZ, L., & BAKKER, R. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. **Wageningen UR-Food & Biobased Research**, 2010.

HENDRIKS, A., ZEEMAN, G. Review: pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic. Biomass. **Bioresource and Technology** 100, 10–18, 2009.

HOUFANI, A. A., ANDERS, N., SPIESS, A. C., BALDRIAN, P., & BENALLAOUA, S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars—a review. **Biomass and Bioenergy**, 134, 105481, 2020.

INGLE, A. P., CHANDEL, A. K., & DA SILVA, S. S. **Lignocellulosic Biorefining Technologies**. Wiley-Blackwell. 2020.

ISHOLA, M. M., BRANDBERG, T., & TAHERZADEH, M. J. Simultaneous glucose and xylose utilization for improved ethanol production from lignocellulosic biomass through SSFF with encapsulated yeast. **Biomass and bioenergy**, 77, 192-199, 2015.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current opinion in biotechnology** 17(3), 320-326, 2006.

JONSSON, L. J. & MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

KARHUMAA, K., FROMANGER, R., HAHN-HÄGERDAL, B., GORWA-GRAUSLUND, M. F. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, 73(5), 1039-1046, 2007.

KAMOLDEEN, A. A., LEE, C. K., ABDULLAH, W. N. W., & LEH, C. P. Enhanced ethanol production from mild alkali-treated oil-palm empty fruit bunches via co-fermentation of glucose and xylose. **Renewable Energy**, 107, 113-123, 2017.

KILIAN SG, VAN UDEN N. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 27:545–8. 1988.

KLASSON, K. T., DIEN, B. S., & HECTOR, R. E. Simultaneous detoxification, saccharification, and ethanol fermentation of weak-acid hydrolyzates. **Industrial Crops and Products**, 49, 292-298, 2013.

KO, J. K.; UM, Y.; LEE, S. M. Effect of manganese ions on ethanol fermentation by xylose isomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* under acetic acid stress. **Bioresource Technology**. n. 222, p. 422-430, 2016.

KONEMAN, E. W.; WINN, W, C. **Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas colorido**. 6. ed. Editora Guanabara-Koogan, 2008.

KRASZNAI, D. J., CHAMPAGNE HARTLEY, R., ROY, H. M., CHAMPAGNE, P., & CUNNINGHAM, M. F. Compositional analysis of lignocellulosic biomass: conventional methodologies and future outlook. **Critical reviews in biotechnology**, 38(2), 199-217, 2018.

KRISHNA, S. H., REDDY, T. J., & CHOWDARY, G. V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresource technology**, 77(2), 193-196, 2001.

KHOT, M., RAUT, G., GHOSH, D., ALARCÓN-VIVERO, M., CONTRERAS, D., & RAVIKUMAR, A. Lipid recovery from oleaginous yeasts: Perspectives and challenges for industrial applications. **Fuel** ,259, 116292, 2020.

KUNDU, S., CHAKRAVARTY, I., OJHA, S., KUNDU, K. Design and Development of Antibiotic Fermentation Using Different Processing Strategies: Challenges and Perspectives. **In Applied Microbiology and Bioengineering**. Academic Press. 2019

KUMAR, R., STREZOV, V., WELDEKIDAN, H., HE, J., SINGH, S., KAN, T., & DASTJERDI, B. Lignocellulose biomass pyrolysis for bio-oil production: A review of biomass pre-treatment methods for production of drop-in fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 123, 109763, 2020.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Eds). **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, ed, 5, 2011.

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

LACHANCE, M.A.; BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G.; FELL, J.W.; KURTZMAN, C.P. *Candida* Berkhout (1923). In: KURTZMAN, C.P; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Eds). **The Yeasts: a taxonomic study**. Fifth Revised and Enlarged Edition. Amsterdam: Elsevier, 2011. Cap. 90.

LANDAETA, R., AROCA, G., ACEVEDO, F., TEIXEIRA, J. A., & MUSSATTO, S. I. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. **Applied energy**, v. 102, p. 124-130, 2013.

- LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology reviews**, 10(3-4), 229-242, 1993.
- LANCEFIELD, C. S., PANOVIC, I., DEUSS, P. J., BARTA, K., & WESTWOOD, N. J. Pre-treatment of lignocellulosic feedstocks using biorenewable alcohols: towards complete biomass valorisation. **Green Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 202-214, 2017.
- LANE, S., ZHANG, Y., YUN, E. J., ZIOLKOWSKI, L., ZHANG, G., JIN, Y. S., & AVALOS, J. L. Xylose assimilation enhances the production of isobutanol in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, 117(2), 372-381, 2020.
- LANJEKAR, R.D. & DESHMUKH, D. A review of the effect of the composition of biodiesel on NOx emission, oxidative stability and cold flow properties. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p.1401–1411, 2016.
- LATIF, F.; RAJOCA, M. I. Production of ethanol and xylitol from corncobs by yeasts. *Bioresearch Technology, Essex*, v. 77, p. 57-63, 2001.
- LEITÃO, V. O.; Caracterização de uma bactéria anaeróbica termofílica isolada do rúmen de caprino e análise das enzimas do seu complexo celulolítico. 99 f. **Tese (Doutorado em Biologia Molecular)** - Universidade de Brasília, Brasília. 2015.
- LEE, H., CHO, D. H., KIM, Y. H., SHIN, S. J., KIM, S. B., HAN, S. O., PARK, C. Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* K35 to lignocellulose-derived inhibitory compounds. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 16(4), 755, 2011.
- LEE, S. Y., KIM, H. U., CHAE, T. U., CHO, J. S., KIM, J. W., SHIN, J. H., & JANG, Y. S. A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals. **Nature Catalysis**, 2(1), 18-33, 2019.
- LI, K., XIA, J., MEHMOOD, M. A., ZHAO, X. Q., LIU, C. G., & BAI, F. W. Extracellular redox potential regulation improves yeast tolerance to furfural. **Chemical Engineering Science**, 196, 54-63, 2019.
- LISOV, A. V., BELOVA, O. V., LI SOVA, Z. A., VINOKUROVA, N. G., NAGEL, A. S., ANDREEVA-KOVALEVSKAYA, Z. I., BUDARINA, Z. I., NAGORNYKH, M. O. ZAKHAROVA, M. V. SHADRIN, A. M., SOLONIN, A. S. & SOLONIN, A. S. A.; Xylanases of *Cellulomonas flavigena*: expression, biochemical characterization, and biotechnological potential. **AMB Express**, v. 7, n.1, p.5, 2017.
- LIU, F., SHORT, M. D., ALVAREZ-GAITAN, J. P., GUO, X., DUAN, J., SAINT, C., & HOU, L. A. Environmental life cycle assessment of lignocellulosic ethanol-blended fuels: A case study. **Journal of Cleaner Production**, 245, 118933, 2020.
- LOHMEIER-VOGER, E. M.; SOPHER, C. R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 75-81, 1998.
- LORENZI, B. R.; ANDRADE, T. H. N. O etanol de segunda geração no brasil: políticas e redes sociotécnicas. **Revista Brasileira de Ciências Sociais**, v. 34, n. 100, 2019.

LOPES, J. G.; DOS SANTOS, K. C.; COSTA, A. A.; Prospecção tecnológica do uso do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração. **Cadernos de Prospecção**, v. 10, n. 3, p. 590, 2017.

LUCARINI, A. C., FERREIRA, N. L., DE SOUZA, C. D., FRANCISCO, F. P. L., FONSECA, I. R., ROSSI, L. G., & FERREIRA, V. M.; Estudo da remoção de Inibidores de Fermentação após tratamento ácido e enzimático de palha de cana. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v.3, n.2, p.95-111, 2017.

MACHINENI, L. Lignocellulosic biofuel production: review of alternatives. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-13, 2019.

MATEO, S.; ROBERTO, I.C.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A.J.; Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p.196– 203, 2013.

MATSUSHIKA, A., INOUE, H., KODAKI, T., & SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, 84(1), 37-53, **2009**.

MATOS, J. P.; SOUZA, K. R.; SANTOS, A. S.; PANTOJA, L. A.; Fermentação alcoólica de hidrolisado hemicelulósico de torta de girassol por *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 e *Candida akabanensis* UFVJM-R131, **Química nova**, v.XY, p.1-8, 2017.

MARTINS, G. M.. BOCCHINI-MARTINS, D. A., BEZZERRA-BUSSOLI, C., PAGNOCCA, F. C., BOSCOLO, M., MONTEIRO, D. A. GOMES, E.; The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. **brazilian journal of microbiology**, v. 49, n. 1, p. 162-168, 2018.

MCCREADY, R. M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V., & OWENS, H. S.; Determination of starch and amylose in vegetables. Application to pear. **Analytical Chemistry**, v.22, p. 1156, 1950.

MCMILLAN, J. D. Xylose fermentation to ethanol. A review. National Renewable Energy Lab Golden, CO (United States). **1993**.

MELO, W. C.; SILVA, D. B.; SANTA ANNA, LIDIA M. M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA JR, NEI; Produção de etanol a partir de torta de mamona (*Ricinus communis* L.) e avaliação da letalidade da torta hidrolisada para camundongo. **Química Nova**, v. 31, p. 1104-1106, 2008.

MICROBEWIKI.

[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Lignocellulose\\_structure.png](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Lignocellulose_structure.png), 2016

MISHRA, A.; GHOSH, S.. Bioethanol production from various lignocellulosic feedstocks by a novel “fractional hydrolysis” technique with different inorganic acids and co-culture fermentation. **Fuel**, v. 236, p. 544-553, 2019.

MME. Análise de Conjuntura do Biocombustíveis p. <http://www.mme.gov.br>, 2016

- NASEERUDDIN, S.; DESAI, S.; RAO, L. V. Ethanol production from lignocellulosic substrate *Prosopis juliflora*. **Renewable energy**, v. 103, p. 701-707, 2017.
- MODIG, T., LIDEN, G., TAHERZADEH, M.J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochem. J.** 363, 769–776, 2002.
- MOOD, S. H., GOLFESHAN, A. H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G. S., NAJAFI, G. H., GHOLAMI, M., & ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 27, 77-93, 2013.
- MOYSÉS, D. N., REIS, V. C. B., ALMEIDA, J. R. M. D., MORAES, L. M. P. D., TORRES, F. A. G. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and prospects. *International journal of molecular sciences* 17(3), 207, 2016.
- MUSSATTO, S. I., & ROBERTO, I. C. Optimal experimental condition for hemicellulosic hydrolyzate treatment with activated charcoal for xylitol production. **Biotechnology progress**, 20(1), 134-139, 2004.
- NASIDI, M.; AGU, R.; DEENI, Y.; WALKER, G. Improved production of ethanol using bagasse from different sorghum cultivars. *Biomass and Bioenergy* 72, 288-299, 2015.
- NOGUÉ, V.S. & KARHUMAA, K.; Xylose fermentation as a challenge of a commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. **Biotechnology Letter**, v.37, p. 761-772, 2015.
- NGUYEN, Q. A., SMITH, W. A., WAHLEN, B. D., & WENDT, L. M. *Towards Total and Sustainable Utilization of Biomass Resources: A Perspective* (No. INL/JOU-20-57089-Rev000). Idaho National Lab.(INL), Idaho Falls, ID (United States). 2020.
- OGEDA, T. L., & PETRI, D. F. Biomass enzymatic hydrolysis. **Química Nova**, 33(7), 1549-1558, 2010.
- OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, M. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1223-1228, 2006.
- OSIRO, K. O., DE CAMARGO, B. R., SATOMI, R., HAMANN, P. R. V., SILVA, J. P., DE SOUSA, M. V., QUIRINO, B. F., AQUINO, E.A., FELIX, C. R.; Characterization of *Clostridium thermocellum* (B8) secretome and purified cellulosomes for lignocellulosic biomass degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 97, p.43-54, 2017.
- PACIA, Z. M.; PUKALSKI, J.; TURNAU, K.; BARANSKA, M.; KACZOR, A. Lipids, hemoproteins and carotenoids in alive *Rhodotorula mucilaginosa* cells under pesticide decomposition e Raman imaging study. **Chemosphere**. n. 164, p. 1-6, 2016.

PARAWIRA, W., & TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production. **Critical reviews in biotechnology**, 31(1), 20-31, 2011.

PAMPULHA, M. E., & LOUREIRO-DIAS, M. C. Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology letters**, 184(1), 69-72, 2000.

PÉREZ-PIMIENTA, J. A., VARGAS-TAH, A., LÓPEZ-ORTEGA, K. M., MEDINA-LÓPEZ, Y. N., MENDOZA-PÉREZ, J. A., AVILA, S., SINGH, S., MARTINEZ, A. Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv pretreated agave bagasse for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 191-198, 2017.

PITARELO, A. P., SILVA, T. A. D., PERALTA-ZAMORA, P. G., & RAMOS, L. P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química nova**, 35(8), 1502-1509, 2012.

PHAM, P., TUYET-LE, D., THUHUONG, L., & TRONG-ANH, N. Recycling cassava stem to bioethanol by inoculating a novel xylose–glucose fermenting yeast at high initial concentration. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, 39(1), 13286, 2020.

PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A.; The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied microbiology and biotechnology**. v.23, n.3, p.228-233, 1986.

RAMIRES, E. C.; MEGIATTO JR, J. D.; GARDRAT, C.; CASTELLAN, A.; FROLLINI, E. Valorization of an industrial organosolv–sugarcane bagasse lignin: characterization and use as a matrix in biobased composites reinforced with sisal fibers. **Biotechnology and bioengineering**, 107(4), 612-621. 2010

RASMEY, A. H., A ABOSEIDAH, A., M KHALAF, E. S., H AHMED, M., & HAWARY, H. Kinetic models application on glycerol production from glucose by the marine yeast *Candida orthopsilosis*. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, 24(1), 1-12, 2020.

RIZZI, M.; ERLEMANN, P.; BUIHANH, N. A.; Dellweg, H. Xylose Fermentation by Yeasts Purification and Kinetic-Studies of Xylose Reductase from *Pichia-Stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2-3, p. 148-154, Sep 1988.

ROCHA, W.D.; LUZ, J.A.M.; BRUÑA-ROMERO, O. *Adsorção de cobre por carvões ativados de endocarpo de noz macadâmia e de semente de goiaba*. REM: R. Esc. Minas, Ouro Preto, 59(4): 409-414, out. dez. 2006.

ROSA, C.; PÉTER, G. (ED.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Germany: Springer, 577 p. 2006.

ROSSI, R. O. Girassol. Curitiba: **TecnoAgro**, p.333, 1998.



- ROBAK, K., & BALCEREK, M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **Food technology and biotechnology**, 56(2), 174-187, 2018.
- ROVIERO, J. P., FREITA, L. A., FREITA, C. M., TRALLI, L. F., SILVA, A. F., & MUTTON, M. J. R.; Poder calorífico da palha e do bagaço de cana após pré-tratamento e hidrólise. **Ciência & Tecnologia Fatec-JB**, p.10, 2018.
- ROQUE, L. R., MORGADO, G. P., NASCIMENTO, V. M., IENCZAK, J. L., & RABELO, S. C. Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. **Fuel**, 242, 775-787, 2019.
- RUCHALA, J., KURYLENKO, O. O., DMYTRUK, K. V., & SIBIRNY, A. A. Construction of advanced producers of first-and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 47(1), 109-132. (2020).
- SADHUKHAN, J., MARTINEZ-HERNANDEZ, E., AMEZCUA-ALLIERI, M. A., & ABURTO, J. Economic and environmental impact evaluation of various biomass feedstock for bioethanol production and correlations to lignocellulosic composition. **Bioresource Technology Reports**, 7, 100230, 2019.
- SANCHEZ, B., BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme Microb. Technol.** 10, 315–318, 1998.
- SHAHZADI, T.; MEHMOOD, S.; IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; AFROZ, A.; ZEESHAN, N.; SUGHRA, K. Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, 2014.
- SHI, J., ZHANG, L., LI, Y., YU, Q., QIU, W., & LIU, L. Impact of Lignin-Derived Phenolic Compounds on the Growth and Butanol Production of *Clostridium beijerinckii* ZL01. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, 14(1), 146-154. (2020).
- SANTOS, R.S., PIMENTA, J. L. P.; COURA, A. P.; MACEDO, A. L; VANZELA; A. P. F. C.; PANTOJA, L. A.; SANTO, A.S. Avaliação de coprodutos sólidos da cadeia do biodiesel como fonte de carbono para produção de enzimas holocelulolíticas sintetizadas por *Aspergillus tubingensis* AN1257. **Revista Sodebras**, v. 10, n. 112, p. 11-16, 2015.
- SANTOS, R. S., MACEDO, A. L., PANTOJA, L., & SANTOS, A. S.; Composição, sacarificação enzimática e fermentabilidade da torta de pinhão-manso para produção de bioetanol. **Ambiência Guarapuava** (PR), v.13, n.2, p. 271–283, 2018.
- SANTOS, A. A. D., "Desenvolvimento de linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* como plataformas de análise de enzimas e transportadores envolvidos na metabolização de xilose. **Dissertação de mestrado**. Florianópolis, 2017.

- SARRIS, D. & PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. **Engineering in Life Sciences**, v 16, p. 307–329, 2016.
- SCHNEIDER, H., WANG, P. Y., CHAN, Y. K., MALESZKA, R. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, 3(2), 89-92, 1981.
- SHINOJ, S.; VISVANATHAN, R.; PANIGRAHI, S; KOCHUBABU, M. Oil palm fiber (OPF) and its composites: **A review. Industrial Crops and Products**, v.33, p. 7–22, 2011.
- SILVA, D. D., ARRUDA, P. V., DUSSÁN, K. J., & FELIPE, M. G.; Adaptation of *Scheffersomyces stipitis* Cells as a Strategy to the Improvement of Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate. **Chemical Engineering**, v.38, 2014.
- SILVA, M. D.; Produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho (*Zea mays* L.), 2018.
- SINGH, Y. D.; MAHANTA, P; BORA, U.; Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass through proximate, ultimate and compositional analysis for bioenergy production. **Renewable Energy**, v.103, p.490-500, 2017.
- SINGH, N., PURI, M., TULI, D. K., GUPTA, R. P., BARROW, C. J., MATHUR, A. S.; Bioethanol production potential of a novel thermophilic isolate *Thermoanaerobacter* sp. DBT-IOC-X2 isolated from Chumathang hot spring. **Biomass and Bioenergy**, v. 116, p. 122-130, 2018.
- SINGHVI, M. S., & GOKHALE, D. V. Lignocellulosic biomass: Hurdles and challenges in its valorization. **Applied microbiology and biotechnology**, 103(23-24), 9305-9320, 2019.
- SIQUEIRA, M. R. **Efeitos dos produtos de hidrólise de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H<sub>2</sub> por fermentação.** (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo, 2015
- SPATARI, S., BAGLEY, D. M., & MACLEAN, H. L. Life cycle evaluation of emerging lignocellulosic ethanol conversion technologies. **Bioresource technology**, 101(2), 654-667, 2010.
- SPENCER-MARTINS I Transport of sugars in yeasts: implications in the fermentation of lignocellulosic materials. *Bioresour Technol*, 50:51–57, **1994**.
- SRIVASTAVA, A. K., AGRAWAL, P., & RAHIMAN, A. Delignification of rice husk and production of bioethanol. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, 3(3), 10187-10194, 2014.

STAMBUK, B. U., BATISTA, A. S., DE ARAUJO, P. S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, 89(2), 212- 214, 2000.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, 9(6), 433-443, 2008.

SINGH, Y. D.; MAHANTA, P; BORA, U. Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass through proximate, ultimate and compositional analysis for bioenergy production. **Renewable Energy**, v. 103, p. 490-500, 2017.

SIVERS, M., & ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. **Bioresource Technology**, 51(1), 43-52, 1995.

SUN, Y. E., & CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource technology**, 96(14), 1599-1606, 2005.

SUN, Z. Y., TANG, Y. Q., IWANAGA, T., SHO, T., & KIDA, K. Production of fuel ethanol from bamboo by concentrated sulfuric acid hydrolysis followed by continuous ethanol fermentation. **Bioresource technology**, 102(23), 10929-10935, 2011.

TAHERZADEH, M. J., & KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. **BioResources**, 2(3), 472-499, 2007.

TABAÑAG, I. D. F., CHU, I. M., WEI, Y. H., & TSAI, S. L; Ethanol production from hemicellulose by a consortium of different genetically-modified *saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, p.1-11, 2018.

TAVARES, B.; SENE, L.; CHRIST, D. Valorization of sunflower meal through the production of ethanol from the hemicellulosic fraction. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 11, p. 1036-1042, 2016.

TEIXEIRA, T. S.; SIQUEIRA, F. G.; BATISTA, R. D. Enzimas microbianas de desconstrução da parede celular: novas abordagens. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 6, n.1, 2017.

TRAN, P. H. N., KO, J. K., GONG, G., UM, Y., & LEE, S. M. Improved simultaneous co-fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulosic biorefinery. **Biotechnology for Biofuels**, 13(1), 12, 2020.

TRAVAINI, R.; MARTÍN-JUÁREZ, J.; LORENZO-HERNANDO, A.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. OZONOLYSIS: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. **Bioresource technology**, 199, 2-12, 2016.

TOOR, M., KUMAR, S. S., MALYAN, S. K., BISHNOI, N. R., MATHIMANI, T., RAJENDRAN, K., & PUGAZHENDHI, A. An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Chemosphere**, 242, 125080, 2020.

UMMALYMA, S. B.; SUPRIYA, R. D.; SINDHU, R.; BINOD, P.; NAIR, R. B.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E. Biological pretreatment of lignocellulosic

biomass—Current trends and future perspectives. Second and Third Generation of Feedstocks, **Elsevier** 2019, pp. 197-212.

VALINHAS, R. V., PANTOJA, L. A., MAIA, A. C. F., MIGUEL, M. G. C., VANZELA, A. P. F., NELSON, D. L., SANTOS, A. S.; Xylose fermentation to ethanol by new *Galactomyces geotrichum* and *Candida akabanensis* strains. **PeerJ**, **6**, 2018.

VAN DE KAMER, J. H.; VAN GINKEL, L.; Rapid determination of cruser fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, v. 29, p. 239-251, 1952.

VAN DER POL, E. C., BAKKER, R. R., BAETS, P., & EGGINK, G. By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio) chemicals and fuels. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 23, p. 9579-9593, 2014.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forage. **J. Ann. Sci**, v. 26, p.119-128, 1967.

VAN SOEST, P. J. & MOORE, L. A. New chemical method for analysis of forages for the purpose of predicting nutritive value. **Proc. IX inter. Grass**, p.783-789, 1966.

VOHRA, M., MANWAR, J., MANMODE, R., PADGILWAR, S., & PATIL, S.; Bioethanol production: Feedstock and current technologies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p.573-584, 2014.

VERAS, H. C., CAMPOS, C. G., NASCIMENTO, I. F., ABDELNUR, P. V., ALMEIDA, J. R., & PARACHIN, N. S. Metabolic flux analysis for metabolome data validation of naturally xylose-fermenting yeasts. **BMC biotechnology**, 19(1), 1-14. **2019**.

WANG, S.; HE, Z. & YUAN, Q. Xylose enhances furfural tolerance in *Candida tropicalis* by improving NADH recycle. **Chemical Engineering Science**, v. 158, p. 37-40, 2017.

WANG, L., YORK, S. W., INGRAM, L. O., & SHANMUGAM, K. T.; Simultaneous fermentation of biomass-derived sugars to ethanol by a co-culture of an engineered *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource technology**, v. 273, p. 269-276, 2019.

WATANABE, S., SALEH, A. A., PACK, S. P., ANNALURU, N., KODAKI, T., MAKINO, K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing proteinengineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. **Microbiology**, 153(9), 3044-3054, **2007**.

WEBB, S. R.; LEE, H. Regulation of D-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. **Biotechnology Advances**, v. 8, p. 685-697, 1990.

WIEGEL, J., LJUNGDAHL, L. G. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium. **Archives of Microbiology**, 128(4), 343-348, 1981.

WOHLBACH DJ, KUO A, SATO TK, POTTS KM, SALAMOV AA, LABUTTI KM, SUN H, CLUM A, PANGILINAN JL, LINDQUIST EA, LUCAS S, LAPIDUS A, JIN M, GUNAWAN C, BALAN V, DALE BE, JEFFRIES TW, ZINKEL R, BARRY KW, GRIGORIEV IV Comparative genomics of xylosefermenting fungi for enhanced biofuel production. **PNAS**, 108(32):13212–13217, 2011.

YOO, C. G., MENG, X., PU, Y., & RAGAUSKAS, A. J. The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: a comprehensive review. **Bioresource Technology**, 122784, 2020.

ZAKARIA, M.R.; NORRRAHIM, M.N.F.; HIRATA, S.; HASSAN, M.A. Hydrothermal and wet disk milling pretreatment for high conversion of biosugars from oil palm mesocarp fiber. **Bioresource Technology**, v.181, p.263–269, 2015.

ZHANG, K., WELLS, P., LIANG, Y., LOVE, J., PARKER, D. A., & BOTELLA, C.; Effect of diluted hydrolysate as yeast propagation medium on ethanol production. **Bioresource technology**, v. 271, p. 1-8, 2019.

ZHAO, X. Q., & BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of biotechnology**, 144(1), 23-30, 2009.

ZHUANG, X.; WANG, W.; YU, Q.; WANG, W.Q.Q., TAN, X.; ZHOU, G.; YUAN, Z. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresource Technology**, v. 199, p.68–75, 2016.

ZUCARO, A., FORTE, A., BASOSI, R., FAGNANO, M.; FIERRO, A.; Life Cycle Assessment of second generation bioethanol produced from low-input dedicated crops of *Arundo donax* L. **Bioresource Technology**, v.219, p.589-599, 2016.  
89-599, 2016.