

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CAMPUS CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS INIBIDORES NA PRODUÇÃO DE ETANOL
POR *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* ATCC 58376

LILLIAN VIEIRA LEONEL

CASCAVEL – Paraná - Brasil

Março – 2014

LILLIAN VIEIRA LEONEL

INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS INIBIDORES NA PRODUÇÃO DE ETANOL
POR *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* ATCC 58376

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra Luciane Sene

Co-Orientador: Prof. Dr. Divair Christ.

CASCADEL – Paraná - Brasil

Março – 2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada por Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362

L599i Leonel, Lillian Vieira
Influência de compostos inibidores na produção de etanol por
Scheffersomyces (Pichia) stipitis ATCC 58376. / Lillian Vieira Leonel —
Cascavel, PR: UNIOESTE, 2014.
55 f.; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Sene
Co-Orientador: Prof. Dr. Divair Christ
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do
Paraná.
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola,
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas.
Bibliografia.

1. Pentose. 2. Fermentação. 3. Etanol. 4. Compostos inibidores. 5.
Scheffersomyces stipitis. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
II. Título.

CDD 21. ed. 333.79

Dhandara Soares de Lima: revisora de português, normas de elaboração e inglês;
Data de revisão de português, normas e inglês: 26/05/2014.

LILLIAN VIEIRA LEONEL

" Influência de compostos inibidores na produção de etanol por *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* ATCC 58376"

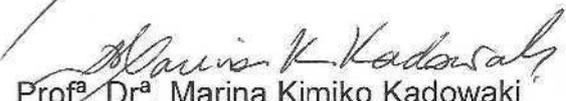
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, **aprovada** pela seguinte banca examinadora:


Orientador: Prof.ª Dr.ª Luciane Sene

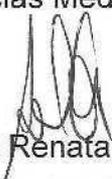
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Unioeste


Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Departamento de Química, UTFPR


Prof.ª Dr.ª Marina Kimiko Kadowaki

Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Unioeste


Prof.ª Dr.ª Sílvia Renata Machado Coelho

Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Unioeste

Cascavel, 18 de março de 2014.

BIOGRAFIA

Lillian Vieira Leonel, nascida em Ivaiporã – PR, ingressou no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL, no ano de 2006, concluindo este em 2009. Em 2011 ingressou no Curso de Pós-graduação *Lato Sensu* em Educação e Gestão Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, concluído em 2012. Em 2012 iniciou o Curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola – Área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, com bolsa CAPES, no qual desenvolveu o projeto de dissertação na área de Saneamento Ambiental, sob orientação da Profa. Dra. Luciane Sene e co-orientação do Prof. Dr. Divair Christ.

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Antonia e Jocir, meus irmãos, Bruno e Raquel, ao meu querido companheiro, Janksyn, por todo o apoio e o incentivo em mais esta conquista e aos meus amados avós Maria e Benedito (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido mais esta conquista em minha vida;

À Professora Dra. Luciane Sene, pela orientação, confiança e paciência durante a realização deste trabalho;

Ao Professor Dr. Divair Christ, pela co-orientação e por todas as contribuições dadas durante o desenvolvimento do trabalho;

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, pela oportunidade e a estrutura para a realização do curso e desta pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro;

À Professora Dra. Sílvia Renata Machado Coelho por toda a disponibilidade em sanar as dúvidas ao longo do trabalho;

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação, por todo o conhecimento e o aprendizado adquiridos durante a realização dos créditos;

Às minhas irmãs de laboratório Danielle Camargo, Isamara Godoi e Bruna Tavares, pela agradável convivência, a paciência e por toda a ajuda ao longo do trabalho;

A todos os colegas da pós-graduação pela convivência durante a realização do curso;

À Larissa Schmatz Mallmann, pela realização das análises no HPLC;

Aos funcionários da UNIOESTE;

À minha família por todo apoio;

Ao meu companheiro Janksyn Bertozzi, por todo o apoio, o incentivo, a paciência, o amor e o carinho.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS INIBIDORES NA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* ATCC 58376

Para suprir a demanda crescente de bioetanol há necessidade de buscar novas fontes de matérias-primas renováveis e tecnologias emergentes. A maior parte dos estudos tem sido direcionada à celulose, visto que esta fração é mais abundante na biomassa e sua hidrólise resulta em glicose, açúcar mais facilmente metabolizável por leveduras comercialmente disponíveis. Considerando que a hemicelulose representa 20-30% da biomassa vegetal e é facilmente extraível, seja por hidrólise ácida ou enzimática, a utilização desta fração por leveduras fermentadoras de pentoses, como *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, tem se mostrado promissora. No entanto, o processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica para liberação dos açúcares fermentescíveis, em específico a hidrólise ácida, gera compostos tóxicos que prejudicam o metabolismo microbiano e a produção de etanol. Assim, é importante o conhecimento dos efeitos distintos dos principais inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos no metabolismo de *S. stipitis* ATCC 58376. Para isso foram realizados cultivos em meio sintético, adicionado de diferentes concentrações dos inibidores furfural, HMF, ácido acético, ácido siríngico e vanilina, seguindo o planejamento fatorial Plackett e Burman com 12 ensaios (7 ensaios a mais em relação ao número de variáveis independentes) e 4 ensaios no ponto central, totalizando 16 ensaios. Os ensaios foram conduzidos sob agitação de 200 rpm, temperatura de 30 °C e pH inicial 5,25 por 96 horas. A análise dos perfis cinéticos obtidos mostrou que o consumo de açúcares, o crescimento celular e a produção de etanol por *S. stipitis* foram afetados negativamente pela adição de compostos inibidores em meio sintético, promovendo a inibição do crescimento celular e produção de etanol, bem como o retardo no consumo de açúcares (glicose e xilose) de acordo com as concentrações dos inibidores testadas. No entanto, o ácido acético em concentração de 2,0 g/L favoreceu o metabolismo de *S. stipitis*, nos ensaios 09 (furfural: 0,025 g.L⁻¹; HMF: 0,01 g.L⁻¹; ácido acético 2,0 g.L⁻¹; vanilina: 0,09 g.L⁻¹ e ácido siríngico: 0,75 g.L⁻¹), 10 (furfural: 0,75 g.L⁻¹; HMF: 0,01 g.L⁻¹; ácido acético 2,0 g.L⁻¹; vanilina: 0,09 g.L⁻¹ e ácido siríngico: 0,75 g.L⁻¹) e 02 (furfural: 0,75 g.L⁻¹; HMF: 0,03 g.L⁻¹; ácido acético 2,0 g.L⁻¹; vanilina: 0,09 g.L⁻¹ e ácido siríngico: 0,025 g.L⁻¹), sendo as máximas concentrações de etanol obtidas em 72 horas de 14,3 g.L⁻¹, 12,43 g.L⁻¹ e 10,75 g.L⁻¹, respectivamente, sendo valores superiores ao ensaio controle (10,05 g.L⁻¹), que não possuía inibidores. Nos testes com 6,0 g.L⁻¹ de ácido acético, o metabolismo da levedura foi completamente inibido. A análise estatística para a resposta crescimento celular mostrou que somente o ácido acético foi significativo ($p < 0,10$), mostrando-se o mais potente inibidor. Os demais inibidores também apresentaram efeito negativo, exceto o ácido siríngico, que apresentou efeito positivo em 72 e 96 horas, porém não foram estatisticamente significativos. Para a resposta produção de etanol, entre os fatores avaliados, somente o efeito do furfural não foi significativo ($p > 0,10$). Os mais potentes inibidores foram o ácido acético e o HMF, enquanto vanilina e ácido siríngico promoveram um efeito positivo na produção de etanol. Esses resultados contribuem para a escolha de um método de destoxificação adequado para o hidrolisado hemicelulósico, que vise uma maior remoção dos compostos que realmente afetam o metabolismo de *S. stipitis* ATCC 58376.

Palavras-chave: pentose, fermentação, etanol, *Scheffersomyces stipitis*, compostos inibidores.

ABSTRACT

INFLUENCE OF INHIBITOR COMPOUNDS IN ETHANOL PRODUCTION BY *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* ATCC 58376

To supply the increasing demand for bioethanol it is necessary to search for new sources of renewable raw materials and emerging technologies. Most studies have been directed to the cellulose, since this fraction is more abundant in biomass and its hydrolysis leads to glucose, a more easily metabolizable sugar for the commercially available yeasts. Considering that the hemicellulose represents 20-30% of plant biomass and is easily removable, either by acid or enzymatic hydrolysis, the use of this fraction by pentose-fermenting yeasts as *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* has been promising. However, the process of hydrolysis of lignocellulosic biomass to the release of fermentable sugars, specifically the acid hydrolysis, generates toxic compounds that impair the microbial metabolism and ethanol production. Thus, it is important to know the different effects of the major inhibitors present in hemicellulosic hydrolysates in the metabolism of *S. stipitis* ATCC 58376. For this purpose the culture was performed in synthetic medium supplemented with different concentrations of the inhibitors furfural, HMF, acetic acid, syringic acid and vanillin, following the Plackett and Burman factorial design with 12 assays (7 assays more compared to the number of independent variables) and 4 assays at the central point, totalizing 16 assays. The assays were conducted under agitation of 200 rpm at 30 °C and pH 5.25 for 96 hours. The analysis of the kinetic profiles obtained showed that the consumption of sugars, cell growth and ethanol production by *S. stipitis* were adversely affected by the addition of inhibitor compounds in synthetic medium promoting the inhibition of cell growth and ethanol production, as well as the delay in the consumption of sugars (xylose and glucose) according to the concentrations of the inhibitors tested. However, the acetic acid concentration of 2.0 g / L favored *S. stipitis* metabolism in the assays 09 (furfural 0.025 g.L⁻¹; HMF: 0.01 g.L⁻¹; acetic acid: 2.0 g.L⁻¹, vanillin: 0.09 g.L⁻¹ and syringic acid: 0.75 g.L⁻¹), 10 (furfural: 0.75 g.L⁻¹ HMF: 0,01 g.L⁻¹; vanillin: 0.09 g.L⁻¹ and syringic acid: 0.75 g.L⁻¹) and 02 (furfural: 0.75 g.L⁻¹; HMF: 0.03 g.L⁻¹; acetic acid 2.0 g.L⁻¹; vanillin: 0.09 g.L⁻¹ and syringic acid: 0.025 g L⁻¹), with peak concentrations of ethanol obtained in 72 hours of 14.3 g.L⁻¹, 12.43 g.L⁻¹ and 10.75 g.L⁻¹, respectively, higher than the control assay (10.05 g.L⁻¹), that lacked inhibitors. In assays with 6.0 g.L⁻¹ of acetic acid, the metabolism of the yeast was completely inhibited. Statistical analysis for cell growth response showed that only acetic acid was significant (p < 0.10), being the most potent inhibitor. The others inhibitors also showed negative effect, except for syringic acid, which had a positive effect at 72 and 96 hours, but were not statistically significant. For the response ethanol production, among the factors evaluated, only the effect of furfural was not significant (p > 0.10). The most potent inhibitors were acetic acid and HMF, while vanillin and syringic acid promoted a positive effect on ethanol production. These results contribute to the choice of an appropriate method of detoxification for hemicellulosic hydrolyzate, which aims for a greater removal of the compounds that actually affect the metabolism of *S. stipitis* ATCC 58376.

Keywords: pentose, fermentation, ethanol, *Scheffersomyces stipitis*, inhibitors compounds.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xi
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Biomassa lignocelulósica	15
3.2 Etanol de segunda geração	17
3.2.1 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica	18
3.2.2 Compostos inibidores.....	20
3.2.3 Metabolismo de xilose em leveduras	21
3.2.4 Efeito dos inibidores no metabolismo de leveduras.....	23
3.2.5 Estratégias para melhorar a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Micro-organismo	28
4.2 Preparo do inóculo.....	29
4.3 Efeito da presença de inibidores na produção de etanol por <i>S. stipitis</i>	29
4.4 Métodos analíticos	31
4.4.1 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético e etanol	31
4.4.2 Determinação da concentração de furfural, hidroximetilfurfural, ácido siríngico e vanilina	31
4.4.3 Determinação da concentração celular	32
4.4.4 Determinação do pH.....	32
4.5. Cálculo dos parâmetros fermentativos	32
4.5.1 Fator de conversão de açúcares totais consumido em etanol ($Y_{P/S}$).....	32
4.5.2 Fator de conversão de açúcares totais em células ($Y_{X/S}$)	33
4.5.3 Produtividade volumétrica em etanol (Q_p).....	33
4.5.4 Eficiência de conversão ($\eta\%$).....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Efeito de compostos inibidores sobre o crescimento celular, o consumo de açúcares e a produção de etanol por <i>S. stipitis</i> ATCC 58376.....	35
5.1.1 Crescimento celular	35
5.1.2 Consumo de açúcares	37
5.1.3 Concentração de ácido acético e avaliação do pH.....	42
5.1.4 Parâmetros fermentativos da produção de etanol	44

5.2 Avaliação do efeito dos compostos inibidores no crescimento e produção de etanol por <i>S. stipitis</i> ATCC 58376 através da análise estatística do planejamento Plackett e Burman	12
.....	46
6 CONCLUSÕES	53
7 REFERÊNCIAS	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição do meio sintético utilizado para cultivo das células para o preparo do inóculo e para a realização dos ensaios de fermentação.....	29
Tabela 2 Concentrações dos compostos inibidores adicionados ao meio sintético	29
Tabela 3 Matriz de planejamento experimental de Plackett e Burman para 12 ensaios com 4 repetições no ponto central, utilizada para realização do experimento.	30
Tabela 4 Matriz do planejamento Plackett e Burman 12 contendo os resultados obtidos para crescimento celular após 72 e 96 horas do cultivo de <i>S. stipitis</i> ATCC 58376 na presença de compostos inibidores adicionados em meio sintético.....	35
Tabela 5 Matriz do planejamento Plackett e Burman 12 contendo os resultados obtidos para produção de etanol após 72 e 96 horas do cultivo de <i>S. stipitis</i> ATCC 58376 na presença de compostos inibidores adicionados em meio sintético e sem inibidores	40
Tabela 6 Parâmetros fermentativos da produção de etanol pela levedura <i>S. stipitis</i> ATCC 58376 durante o cultivo em meio sintético adicionado de diferentes concentrações de compostos inibidores, após 72 horas.....	45
Tabela 7 Parâmetros fermentativos da produção de etanol pela levedura <i>S. stipitis</i> ATCC 58376 durante o cultivo em meio sintético adicionado de diferentes concentrações de compostos inibidores, após 96 horas.....	46
Tabela 8 Efeitos principais do planejamento Plackett e Burman 12 para a resposta crescimento celular por <i>S. stipitis</i> após 72 horas	47
Tabela 9 Efeitos principais do planejamento Plackett e Burman 12 para a resposta crescimento celular por <i>S. stipitis</i> após 96 horas	47
Tabela 10 Efeitos principais do planejamento Plackett e Burman 12 para a resposta produção de etanol por <i>S. stipitis</i> após 72 horas.....	50
Tabela 11 Efeitos principais do planejamento Plackett e Burman 12 para a resposta produção de etanol por <i>S. stipitis</i> após 96 horas.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da molécula da celulose..	15
Figura 2 Estrutura da molécula da hemicelulose.....	16
Figura 3 Representação dos alcoóis precursores das unidades fenilpropanóides que compõem a estrutura da lignina.....	16
Figura 4 Representação simplificada das etapas de produção de etanol de segunda geração.....	18
Figura 5 Representação esquemática do efeito do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica..	19
Figura 6 Reações que ocorrem durante a hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica.	20
Figura 7 Reações que ocorrem na formação de compostos fenólicos vanilina e ácido siríngico.....	21
Figura 8 Esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras..	22
Figura 9 Fluxograma simplificado das etapas do experimento.	28
Figura 10 Crescimento celular da levedura <i>S. stipitis</i> durante o cultivo em meio sintético adicionado de compostos inibidores e sem inibidores.....	36
Figura 11 Consumo de glicose (A) e xilose (B) durante o cultivo de <i>S. stipitis</i> em meio sintético adicionado de compostos inibidores e sem inibidores.....	38
Figura 12 Produção de etanol durante o cultivo de <i>S. stipitis</i> em meio sintético adicionado de compostos inibidores e sem inibidores.....	41
Figura 13 Variação nas concentrações de ácido acético (A) e nos valores de pH (B) durante o cultivo de <i>S. stipitis</i> em meio sintético.....	43
Figura 14 Gráficos de Pareto para a variável crescimento celular após 72 horas (A) e 96 horas (B) do cultivo de <i>S. stipitis</i> em meio sintético adicionado de diferentes concentrações de compostos inibidores.	49
Figura 15 Gráficos de Pareto para a variável produção de etanol após 72 horas (A) e 96 horas (B) do cultivo de <i>S. stipitis</i> em meio sintético adicionado de diferentes concentrações de compostos inibidores.	51

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

LAETF	Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações
LAAA	Laboratório de Análises Agro-Ambientais
HMF	Hidroximetilfurfural
pH	Potencial hidrogeniônico
XR	Xilose redutase
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzido
XDH	Xilitol Desidrogenase
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídio oxidado
EMP	Embden Meyerhoff Parnas
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
PB	Plackett e Burman
Y_{P/S}	Fator de conversão de xilose em etanol
Y_{X/S}	Fator de conversão de xilose em células
Q_p	Produtividade volumétrica em etanol
η	Eficiência de conversão

1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola gera uma diversidade de materiais lignocelulósicos como bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, sabugo de milho, casca de arroz, farelo de girassol dentre outros, com potencial uso na produção de etanol de segunda geração. Assim, o melhor aproveitamento desses materiais é uma alternativa para minimizar os impactos negativos ao meio ambiente, além de contribuir com a matriz energética nacional e agregar valores às culturas.

Diante disso, pesquisas são realizadas objetivando a otimização do processo de produção etanol a partir de materiais lignocelulósicos visando sua aplicação em escala industrial. Maior atenção tem sido dada à fração celulósica, visto que a glicose gerada a partir de sua hidrólise é facilmente fermentada a etanol por leveduras comerciais, como *Saccharomyces cerevisiae*, com altos rendimentos. Considerando que a hemicelulose constitui uma porção considerável da biomassa e sua hidrólise resulta em altas concentrações de pentoses, principalmente xilose, é importante o aproveitamento desses açúcares de forma a contribuir para a viabilidade econômica da produção de etanol de segunda geração.

No entanto, existem algumas limitações quanto ao uso da fração hemicelulósica para a produção de etanol, como a formação de compostos inibidores durante a etapa de hidrólise ácida, necessária para disponibilizar os açúcares presentes. Esses inibidores interferem no processo de fermentação por afetar o desempenho dos micro-organismos utilizados no processo.

Para melhorar as condições do processo de produção de etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos, foram desenvolvidas metodologias para a redução da concentração desses inibidores; porém, tais procedimentos acabam gerando custos além de outras desvantagens, como a perda de açúcares e a redução do volume do hidrolisado.

O potencial de adaptação de linhagens de micro-organismos às condições adversas durante o processo pode contribuir para a redução dos efeitos desses inibidores, sendo uma alternativa para melhorar o desempenho da fermentação, reduzindo etapas complementares do processo.

Trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAETF) da UNIOESTE resultaram em duas dissertações, Camargo (2012) e Tavares (2013), as quais tiveram como objetivo a otimização das condições de cultivo da levedura *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* ATCC 58376 e melhores rendimentos de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol. No entanto, por se tratar de uma linhagem pouco estudada, não há relatos sobre o efeito de compostos inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos sobre seu metabolismo.

Nesse contexto, as informações obtidas através deste estudo trarão grande contribuição para a seleção de linhagens de micro-organismos capazes de superar as adversidades encontradas durante a fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar os efeitos dos compostos inibidores no metabolismo da levedura *S. stipitis* ATCC 58376. Para isso, os objetivos específicos foram:

- Avaliar o consumo de açúcares, o crescimento celular e a produção de etanol por *S. stipitis* ATCC 58376 na presença de diferentes concentrações de ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, ácido siríngico e vanilina;
- Identificar os compostos e suas respectivas faixas de concentração mais prejudiciais ao metabolismo celular e parâmetros fermentativos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica apresenta potencial uso na produção de etanol devido à grande disponibilidade no meio ambiente, por ser uma fonte renovável de açúcares, aliado ao baixo custo (DELGENES et al., 1996). Os principais componentes da biomassa são a celulose, hemicelulose e a lignina (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; TELLI-OHUR; EKEN-SARAÇOĞLU, 2008).

A celulose (Figura 1) é um componente muito abundante, representando 40 a 50% do peso seco da biomassa, sendo que, no bagaço de cana-de-açúcar, corresponde a 43% (SUN et al., 2004). A celulose consiste em um polímero com estrutura linear, de alto peso molecular, formado por várias moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (FOYLE; JENNINGS; MULCAHY, 2007).

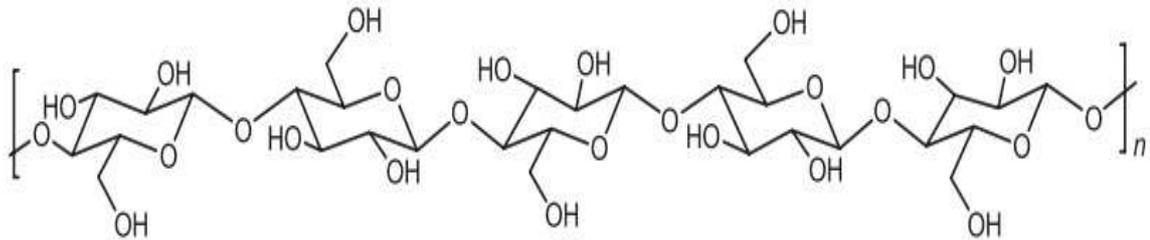


Figura 1 Estrutura da molécula da celulose.
Fonte: Santos et al. (2012).

A hemicelulose (Figura 2) consiste em polissacarídeos ramificados, constituídos de pentoses como xilose e arabinose e de hexoses como manose, glicose e galactose (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). A fração hemicelulose representa 25-35% da biomassa seca vegetal (SUN et al., 2004) e é facilmente extraível, seja por hidrólise ácida ou enzimática (GÍRIO et al., 2010). No bagaço de cana-de-açúcar, este componente corresponde a 33% da biomassa seca (SUN et al., 2004).

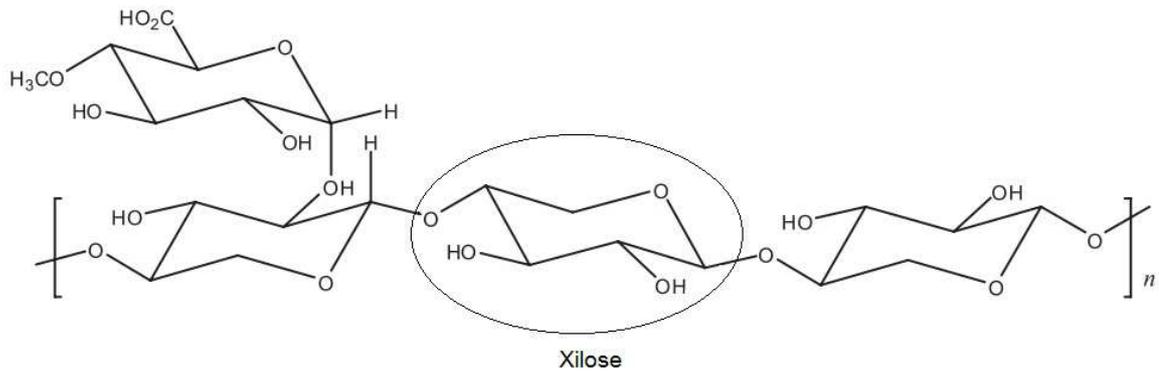


Figura 2 Estrutura da molécula da hemicelulose.

Fonte: Santos et al. (2012).

A lignina é uma macromolécula sintetizada a partir de precursores fenilpropanóides (guaiacil (G), siringil (S) e p-hidroxifenil (H)), com alto peso molecular, estrutura irregular, além de ser altamente insolúvel e recalcitrante (WONG, 2009). Segundo Barbosa et al. (2008), os monômeros que compõem a lignina são derivados dos alcoóis coniferílico (G), sinapílico (S) e p-cumarílico (H). O teor de lignina varia de acordo com a espécie de planta, sendo 18,6% em bagaço de sorgo sacarino (SHEN et al., 2011), 23% em bagaço de cana e em bambu e 29% em eucalipto (ALVES et al., 2010). Os alcoóis precursores das unidades fenilpropanóides da lignina estão representados na Figura 3.

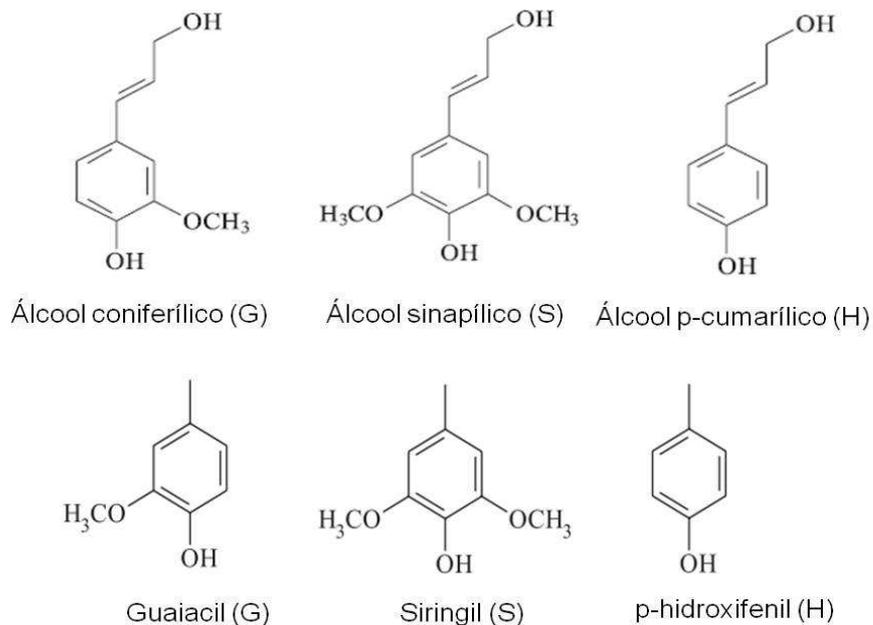


Figura 3 Representação dos alcoóis precursores das unidades fenilpropanóides que compõem a estrutura da lignina.

Fonte: Adaptado de Barbosa et al. (2008) e Budziak et al. (2004).

3.2 Etanol de segunda geração

O etanol é considerado uma alternativa para a diminuição dos problemas energéticos e ambientais por se tratar de uma fonte de energia renovável e por contribuir com a redução de emissões de dióxido de carbono para atmosfera.

O Brasil apresenta-se em uma posição de destaque em relação à inserção de renováveis na matriz energética nacional, com uma participação de 45,1% em 2010, de 44,1% em 2011, enquanto que a média mundial, em 2009, foi de 13,3% (BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL, 2012).

Para os próximos anos, a produção de biocombustíveis como o etanol estará associada aos materiais lignocelulósicos, como bagaço de cana, entre outros, sem a necessidade de expansão de áreas agrícolas (SOCCOL et al., 2010).

Empresas do setor sucroenergético brasileiro estão com projetos de plantas piloto para produção de etanol de segunda geração, como a GraalBio, que tem previsão para inaugurar em 2014, a primeira usina de etanol de segunda geração de porte comercial do Brasil (GRAALBIO, 2012). A empresa Petrobrás tem previsão para comercializar o etanol de segunda geração até 2015 e já produziu o biocombustível em caráter experimental, que foi utilizado em veículos que circularam na Conferência Rio+20 em junho de 2012 (UNICA, 2013). A Raízen Energia espera iniciar as atividades até 2015 da sua primeira unidade produtora de etanol de segunda geração, aproveitando a estrutura já implantada na região, a Usina Costa Pinto, em Piracicaba (SP), integrando a produção do etanol de primeira geração ao de segunda geração (BNDES, 2013).

A decisão sobre a produção de etanol de segunda geração deve levar em consideração os custos de oportunidades para os diferentes produtos derivados da biomassa (etanol e outros biocombustíveis; bioeletricidade e açúcar, entre outros) (DIAS et al., 2011). Estudos econômicos de vários cenários de produção de etanol mostraram que a produção integrada de etanol de primeira geração e segunda geração contribui para a redução de custos do processo (DIAS et al., 2011).

Apesar da previsão de operação de plantas piloto para produção de etanol de segunda geração para 2014/2015, é fundamental o aprimoramento das tecnologias já implantadas para a produção do etanol de primeira geração e o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção do etanol a partir de biomassa lignocelulósica, a fim de otimizar as condições técnicas a serem aplicadas no processo de produção integrada.

O etanol de segunda geração pode ser produzido tanto a partir de hexoses como de pentoses, conforme esquema da Figura 4.

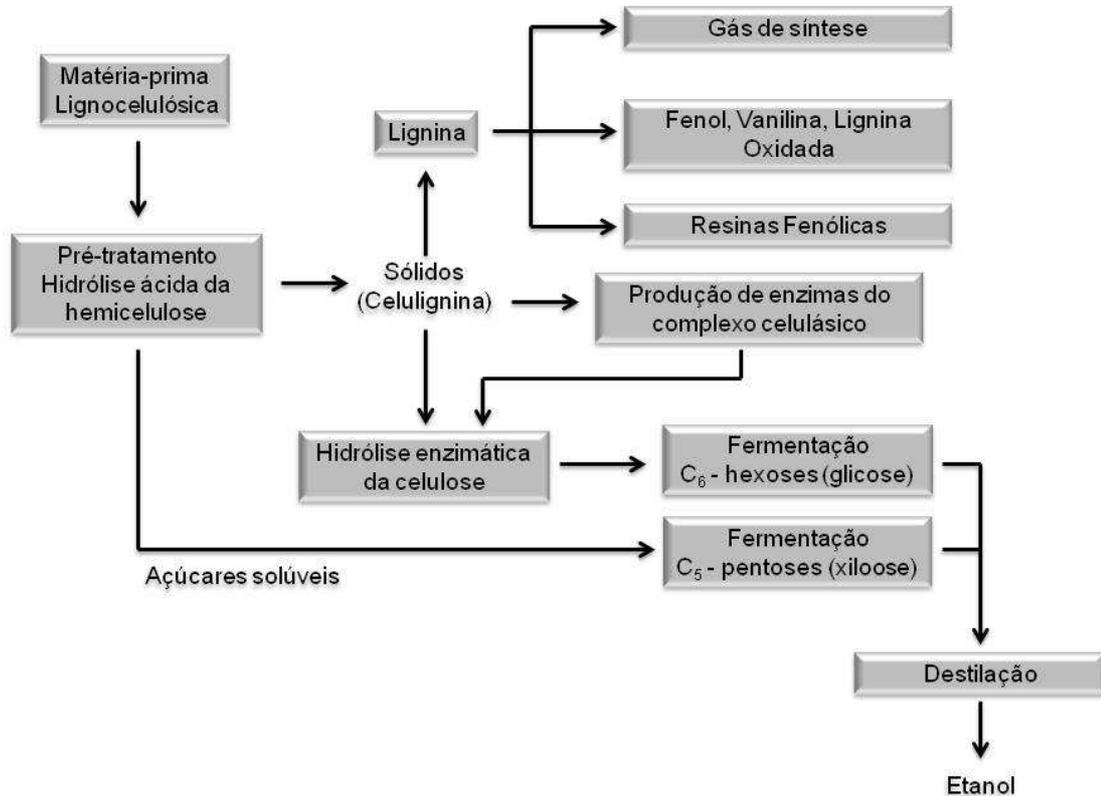


Figura 4 Representação simplificada das etapas de produção de etanol de segunda geração.

Fonte: Adaptado de Wingren (2003) e Pereira Jr. et al. (2008).

3.2.1 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica

Para a utilização da biomassa lignocelulósica visando a produção de bioetanol, são necessários pré-tratamentos visando à quebra das ligações das estruturas de seus componentes e à separação das frações celulósica e hemicelulósica do complexo lignina, constituintes da biomassa, como mostra a Figura 5 (SUN; CHENG, 2002). A disponibilização da molécula de celulose, após a etapa de pré-tratamento, aumenta a área superficial, aumentando a acessibilidade às enzimas celulasas, responsáveis pela quebra da celulose em glicose (MOSIER et al., 2005) para posterior fermentação por leveduras, como por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* (EL-ZAWAWY et al., 2011).

Um pré-tratamento deve atender a requisitos como melhor formação de açúcares ou capacidade de formar açúcares posteriormente, por hidrólise enzimática; evitar perdas de açúcares e formação de subprodutos inibitórios do processo de fermentação, além de ser economicamente viável (SUN; CHENG, 2002). Os pré-tratamentos podem ser físicos, químicos ou biológicos, bem como a combinação deles (MOOD et al., 2013).

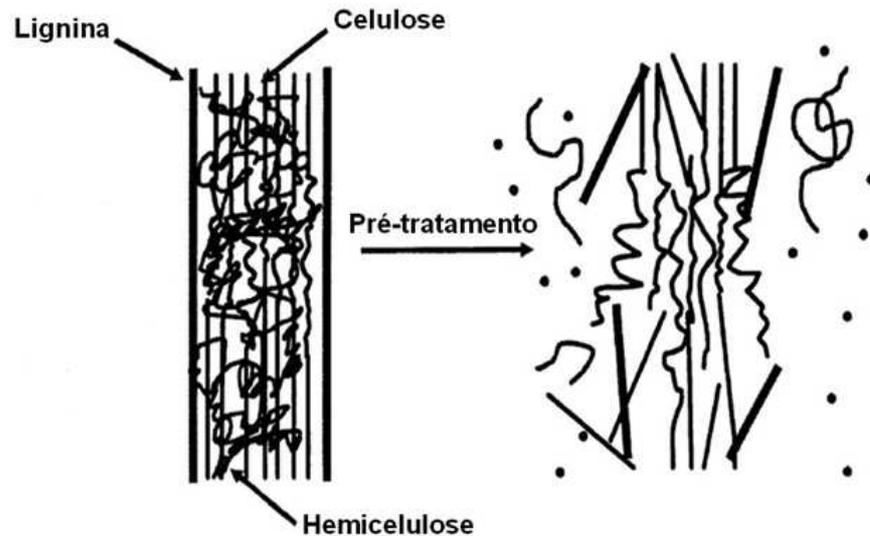


Figura 5 Representação esquemática do efeito do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Fonte: Mosier et al. (2005).

Os processos físicos consistem-se de procedimentos de trituração mecânica, como fragmentação, esfarelamento e moagem (SUN; CHENG, 2002), visando à redução do tamanho das partículas da biomassa lignocelulósica, aumentando a área de superfície (ALVIRA et al., 2010) e normalmente são combinados com outros pré-tratamentos (MOOD et al., 2013).

Os processos químicos apresentam características variáveis, sendo empregados ácidos (sulfúrico, clorídrico), bases (hidróxidos de sódio, potássio e de cálcio), líquidos iônicos (sais orgânicos compostos por cátions e ânions), solventes orgânicos (metanol, etanol, acetona, etilenoglicol e álcool tetrahidrofurfurílico), sendo o mais utilizado o processo de hidrólise ácida, por ser mais favorável em aplicações industriais (ALVIRA et al., 2010).

A hidrólise ácida pode ser realizada em condições que vão desde brandas às mais severas, como altas temperaturas e altas concentrações de ácidos (SUN; CHENG, 2002) e tem como objetivo solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa, tornando a celulose mais acessível às enzimas, enquanto que o pré-tratamento alcalino visa à remoção da lignina, promovendo menor solubilização da celulose e hemicelulose (ALVIRA et al., 2010).

O pré-tratamento biológico consiste na utilização de enzimas produzidas por micro-organismos, como espécies de fungos, a fim de degradar a lignina da biomassa lignocelulósica, aumentando a acessibilidade da celulose para posterior hidrólise enzimática (SHI et al., 2009). O processo é realizado em condições brandas de temperatura, porém tem a desvantagem de demandar maior tempo para a hidrólise (TIAN et al., 2012), pois o processo biológico é lento para aplicações industriais, além do consumo de frações dos açúcares pelo micro-organismo produtor da enzima (AGBOR et al., 2011). Embora o

emprego de métodos menos severos de hidrólise resulte em hidrolisados menos tóxicos, também pode resultar na redução da hidrólise da hemicelulose em monossacarídeos, exigindo, assim, a utilização de enzimas adicionais no processo de sacarificação, aumentando os custos do processo (PIENKOS; ZHANG, 2009).

3.2.2 Compostos inibidores

De acordo com Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), durante o processo de hidrólise, em específico a hidrólise ácida, ocorre a formação de compostos tóxicos como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e fenólicos, que inibem o metabolismo do micro-organismo e influenciam negativamente na eficiência da fermentação e, conseqüentemente, na produção de etanol.

Esses compostos tóxicos são derivados da própria composição dos materiais lignocelulósicos (Figura 6). Segundo Zhu et al. (2011), o ácido acético é um ácido fraco, formado a partir dos grupos acetil que fazem parte da fração hemicelulose. O composto furfural é um aldeído formado a partir de materiais ricos em pentoses, enquanto que o HMF é formado a partir de hexoses (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Os compostos fenólicos como ácido hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído são derivados da degradação da lignina (BARAKAT et al., 2012).

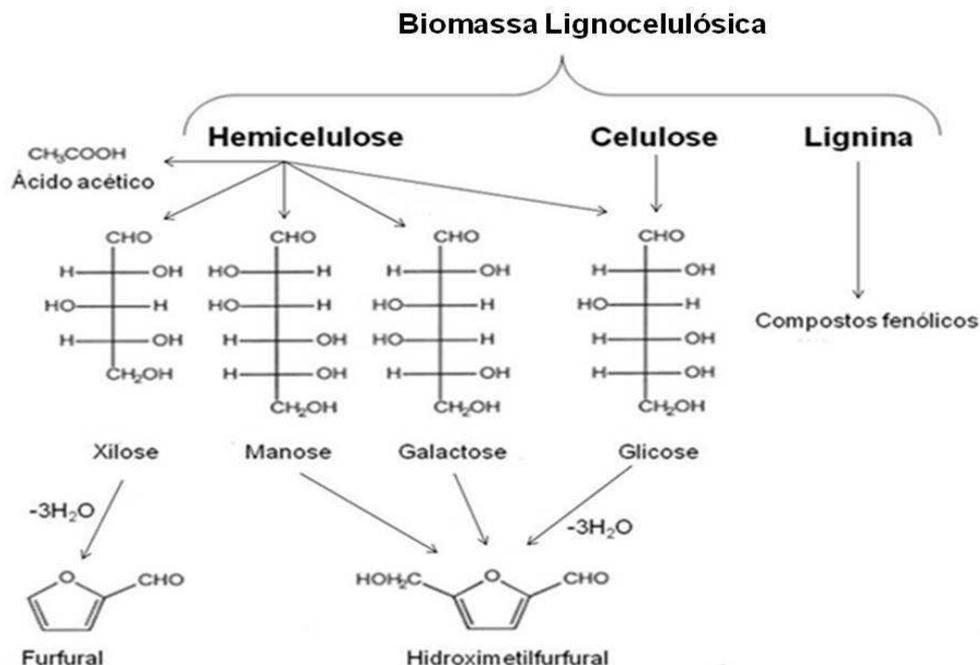


Figura 6 Reações que ocorrem durante a hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica. Fonte: Adaptado de Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000).

A Figura 7 mostra as reações simplificadas que ocorrem na formação dos compostos fenólicos, ácido sirínico e vanilina, no qual por meio de reações de oxidação e hidrólise parcial da lignina, formam compostos aldeídos que podem ser oxidados originando seus respectivos ácidos (PUECH; JOURET; GOFFINET, 1985). As concentrações desses compostos variam de acordo com hidrolisado, sendo encontrados valores como 0,012 e 0,082 g.L⁻¹ de ácido sirínico e 0,053 e 0,066 g.L⁻¹ de vanilina em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar (CUNHA et al., 2006; ARRUDA, 2007).

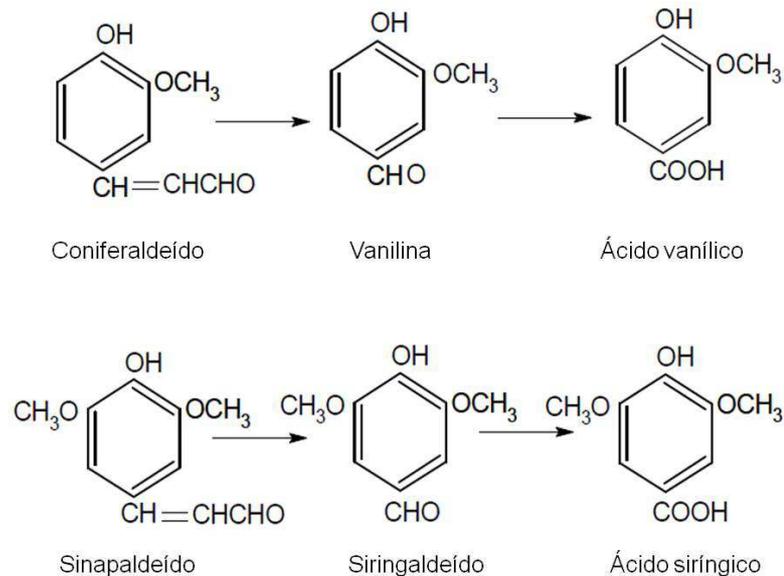


Figura 7 Reações que ocorrem na formação de compostos fenólicos vanilina e ácido sirínico.

Fonte: Adaptado de Reazin (1981) e Nishimura e Matsuyama (1989) apud Aquino (2004).

3.2.3 Metabolismo de xilose em leveduras

A assimilação da xilose por leveduras está condicionada à habilidade que determinadas espécies apresentam em sintetizar enzimas específicas para o metabolismo da xilose (Figura 8). Dentre as leveduras metabolizadoras de xilose, a espécie *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* possui potencial capacidade de fermentar xilose, além de outras hexoses, apresentando altos rendimentos de etanol (NIGAM, 2001).

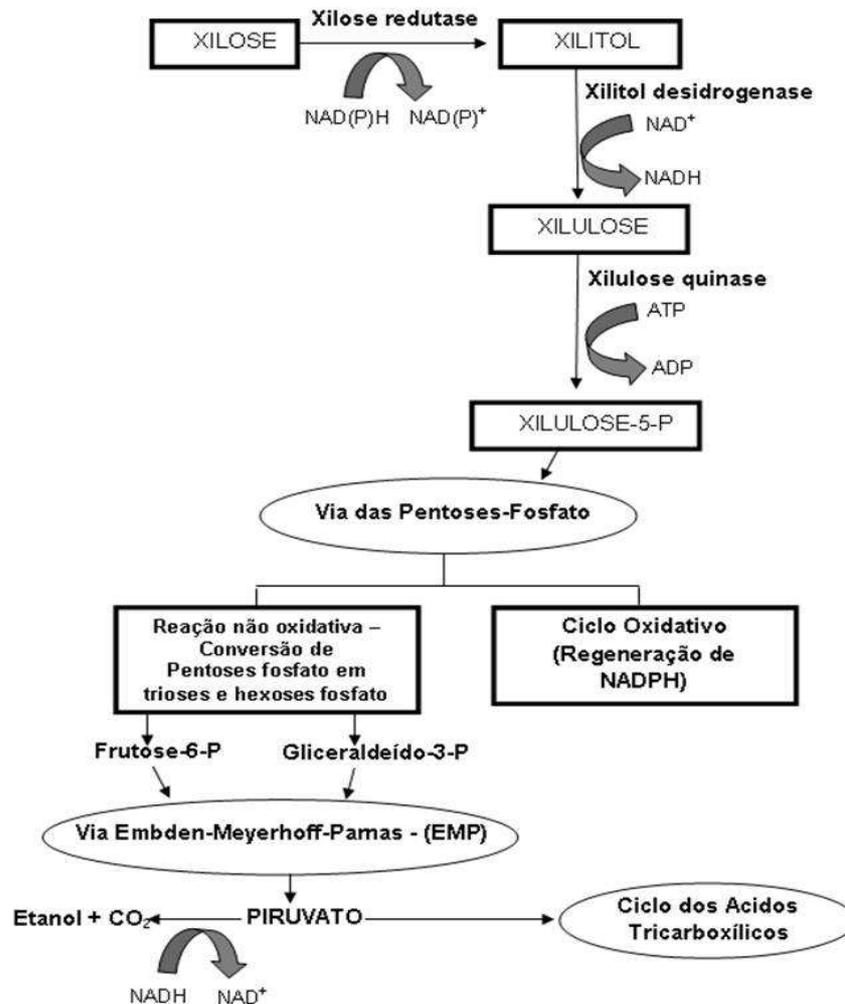


Figura 8 Esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras.
Fonte: Parajó, Domínguez e Domínguez (1998a).

O processo tem início com a entrada da xilose na célula através da membrana celular. Dentro da célula, a xilose é convertida a xilitol, pela ação da enzima xilose redutase (XR), sendo essa reação dependente de co-fatores NADH ou NADPH; posteriormente o xilitol é convertido à xilulose pela ação da enzima xilitol desidrogenase (XDH), dependente do co-fator NAD^+ (ZALDIVAR, NIELSEN; OLSSON, 2001). A xilulose é fosforilada à xilulose 5-fosfato, pela ação da enzima xilulose quinase, seguindo para a via das fosfopentoses onde são formados metabólitos intermediários como a frutose 6-P e o gliceraldeído 3-P, que serão metabolizados na via Embden Meyerhof Parnas (EMP) resultando em piruvato. Este pode ser oxidado ao entrar no ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (Ciclo de Krebs) e assim ocorrer a recuperação dos co-fatores por meio da cadeia respiratória ou seguir para reações de fermentação alcoólica (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994).

Segundo Yablochkova et al. (2003), ocorre variação da atividade e especificidade da enzima xilose redutase aos co-fatores, de acordo com a espécie da levedura. As espécies em que a xilose redutase é dependente de NADPH apresentam potencial para

produção de xilitol. No caso da *S. stipitis*, a enzima xilitol desidrogenase é específica para NAD^+ , enquanto que a xilose redutase apresenta especificidade para ambos os co-fatores, NADPH e NADH, sendo uma espécie potencial produtora de etanol, quando em condições de microaerofilia (YABLOCHKOVA et al., 2003). *S. stipitis* desvia parte do seu metabolismo para produção de etanol, com pouca produção de xilitol (JEFFRIES; VAN VLEET, 2009).

Ao aumentar a atividade da xilose redutase dependente de NADH, o equilíbrio das reações iniciais do metabolismo da xilose é desviado para a formação de xilulose e, em último caso, para a produção de etanol. Assim, a especificidade da enzima xilose redutase aos co-fatores pode afetar a proporção de xilitol e xilulose produzidos (YABLOCHKOVA et al., 2003).

Ao avaliar a atividade da xilose redutase e xilitol desidrogenase e seus co-fatores em leveduras do gênero *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen*, *Pichia* e *Torulopsis*, Yablochkova et al. (2003) verificaram que as leveduras (*Candida didensiae* F-3, *Candida intermediae*, *Candida parapsilosis*, *Candida silvanoru* VGI-II, *Candida tropicalis* -456, *Pichia guilliermondii* Y-1017 e *Torulopsis molishiana* 55, *Kluyveromyces marxianus* Y-488, apresentaram atividade da xilose redutase específica para o co-fator NADPH, sendo leveduras potencialmente produtoras de xilitol, enquanto que as espécies *Pachysolen tannophilus* Y-1532, Y-1533, Y-1634, *Candida shehatae* Y-1632 e *Pichia stipitis* Y-2160 mostraram especificidades para ambos os co-fatores (NADPH e NADH), sendo que no caso das espécies *P. stipitis* e *C. shehatae* a xilose redutase foi mais ativa com NADH, assim, produzem predominantemente etanol.

3.2.4 Efeito dos inibidores no metabolismo de leveduras

Um melhor conhecimento dos mecanismos de respostas de linhagens de leveduras aos compostos inibidores proporciona o desenvolvimento de novas linhagens mais tolerantes aos efeitos tóxicos desses inibidores (LIU et al., 2004). Segundo Delgenes et al. (1996), o grau de inibição varia de acordo com a natureza e a concentração desses compostos, além das características do micro-organismo utilizado.

Os efeitos tóxicos dos compostos inibitórios formados a partir da hidrólise de materiais lignocelulósicos consistem de alterações do pH intracelular, interferindo no transporte de nutrientes e na produção de energia, alterações enzimáticas e de membranas celulares, que interferem no consumo de açúcares, no crescimento do micro-organismo, podendo levar à sua morte (PALMQVIST et al., 1999; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

O ácido acético, quando na forma não dissociada, pode se difundir para o citoplasma da célula, diminuindo o pH intracelular, provocando problemas na geração de

energia e no transporte de nutrientes, levando a um maior requerimento energético da célula em decorrência do bombeamento de prótons para fora da célula, por meio da atividade da enzima ATPase da membrana plasmática, processo que demanda ATP (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989).

Os compostos furfural, um aldeído com características aromáticas, e o hidroximetilfurfural (HMF) atuam na célula de forma semelhante, reduzindo o crescimento, a formação de ATP e de etanol por mecanismos que interferem na respiração e a fosforilação oxidativa, podendo causar a morte do micro-organismo (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Os compostos fenólicos, dentre eles o ácido siríngico e a vanilina, interferem nas membranas celulares, levando à perda da integridade, reduzindo a função de seletividade e a produção de enzimas pelas células (HEIPIEPER et al., 1994).

Ao estudar a resposta de linhagens de *S. stipitis* (NRRL Y-7124) e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 211239 e NRRL Y-12632 aos compostos inibitórios furfural e HMF (10, 30, 60 e 120mM) e uma mistura de furfural e HMF (10, 30 e 60 mM), Liu et al. (2004) observaram crescimento de células de todas as linhagens utilizadas em concentrações de 10mM e 30mM de cada composto individual, enquanto que, na concentração 60mM de HMF, apenas a linhagem ATCC 211239 apresentou crescimento e em 120mM não houve crescimento para ambos inibidores. O tratamento combinado (furfural e HMF) atuou de forma sinérgica, suprimindo o crescimento celular.

Os compostos furfural (0; 0,5; 1,0 e 2,0 g.L⁻¹), vanilina (0; 0,5; 1,0 e 2,0 g.L⁻¹) e siringaldeído (0; 0,5; 1,0 e 2,0 g.L⁻¹) influenciaram negativamente no crescimento de *Candida guilliermondii* de acordo com as concentrações presentes no meio. Quanto maior a concentração do composto, maior o efeito inibitório, sendo que a redução nas taxas de crescimento celular variou de acordo com o composto, evidenciando que existem diferenças no grau de severidade dos efeitos inibitórios de cada composto (KELLY et al. 2008).

Resultados semelhantes foram obtidos por Cortez e Roberto (2010) ao utilizarem a mesma levedura, *C. guilliermondii*, na presença de vanilina e siringaldeído, adicionados em meio sintético em concentrações 0, 1,0 e 2,0 g.L⁻¹, quando observaram que ambos os compostos provocaram inibição do crescimento da levedura em diferentes graus e inibição completa quando os dois compostos foram misturados. Em relação à obtenção do produto, no caso o xilitol, a vanilina não influenciou significativamente, mas houve forte redução na presença de siringaldeído.

Ao estudar os efeitos inibitórios dos compostos furfural (0,25-5,0 g.L⁻¹), HMF (0,25-7,0 g.L⁻¹) e vanilina (0,25-4,0 g.L⁻¹) em um novo isolado da espécie termotolerante de levedura *Issatchenkia orientalis*, Kwon et al. (2011) observaram que a produção de etanol foi afetada por todos os inibidores, além do prolongamento da fase lag do crescimento celular, de acordo com a concentração dos compostos.

Os compostos ácido acético, furfural e HMF promoveram alterações variadas no desempenho de *S. stipitis* DSM 3651, como mostra Bellido et al. (2011), sendo o ácido acético o que mais influenciou de forma negativa essa linhagem, reduzindo a produção de etanol, seguido do furfural, que produziu um atraso no consumo de açúcar e o HMF que não interferiu significativamente. Quando em mistura, observou-se um efeito sinérgico, causando a inibição do processo de fermentação.

O ácido acético também interferiu severamente no crescimento e produção de etanol por *S. stipitis* KCCM 12009, tanto em meio sintético como no hidrolisado de álamo amarelo (tipo de madeira) a uma concentração de 7,1 g.L⁻¹, sendo que o crescimento celular apresentou redução de 71% comparado ao controle e a concentração de etanol foi de 8,9 g.L⁻¹, enquanto que no controle foi de 24,3 g.L⁻¹ (CHO et al., 2010).

Zhang et al. (2012) avaliaram os efeitos de compostos fenólicos derivados da lignina (4-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído e fenol) no crescimento e produção de xilitol por *Candida athensensis* SB18, constatando efeitos negativos significativos tanto na produção de xilitol quanto no crescimento em concentrações a partir de 1,0 g.L⁻¹. A vanilina mostrou-se mais tóxica, seguido do 4-hidroxibenzaldeído – siringaldeído e fenol, observando completa inibição do crescimento celular a uma concentração de 2,0 g.L⁻¹ de vanilina e nenhuma produção de xilitol, enquanto que no controle o crescimento foi de 10,32 g.L⁻¹ e a produção de xilitol 30,05 g.L⁻¹.

3.2.5 Estratégias para melhorar a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos

De acordo com Olsson e Hahn-Hägerdal (1996), existem formas de tentar diminuir as concentrações dos compostos tóxicos, utilizando processos de destoxificação como carvão ativo, mudanças de pH com hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) e ácido sulfúrico (H₂SO₄), colunas de troca iônica, dentre outros.

A bioconversão de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de sorgo destoxificados (com hidróxido de cálcio) a etanol por *Debariomyces hansenii* sp. e por *P. stipitis* NCIM 3497 foi avaliada por Kurian et al. (2010), que obtiveram uma produção máxima de etanol (38,7 g.L⁻¹), por *P. stipitis*, demonstrando o potencial dessa levedura para produção de etanol.

Chandel et al. (2011) estudaram a viabilidade de *P. stipitis* NCIM3498 produzir etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de uma variedade selvagem de cana-de-açúcar, previamente destoxificado com adição de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) até pH 10,5 e posterior filtragem e obtiveram valores de até 21,82 g.L⁻¹ de etanol, de acordo com as condições de pré-tratamento empregadas.

Arslan e Eken-Saraçoğlu (2010) estudaram a viabilidade da produção de etanol pela levedura *P. stipitis* NRRL Y-7124 a partir de hidrolisados hemicelulósicos de cascas de avelãs destoxificadas por meio de calagem com 3% de hidróxido de sódio (NaOH) combinado com óxido de cálcio (CaO) e carvão ativo e obtiveram a produção de 16,79 g.L⁻¹ a partir de uma concentração inicial de 50 g.L⁻¹ de açúcares redutores após suplementação parcial com xilose, necessária devido a perdas de açúcares decorrentes da destoxificação.

A escolha de linhagens tem sido apontada como uma estratégia para se obter uma melhor fermentabilidade dos hidrolisados lignocelulósicos. O estudo da viabilidade do hidrolisado hemicelulósico de madeira visando à produção de etanol foi realizado por Cho et al. (2011), que utilizaram *P.stipitis* KCCM 12009 para fermentação, obtendo-se uma produção máxima de etanol de até 25,6 g.L⁻¹. Shupe e Liu (2012) também utilizaram hidrolisado de extrato de madeira para produção de etanol por duas linhagens de *P. stipitis* NRRL Y-11543 e NRRL Y-7124 e duas linhagens de *Candida shehatae* NRRL Y-12858 e 12854. A linhagem de *S. stipitis* NRRL Y-11543 foi mais promissora dentre as quatro linhagens de leveduras utilizadas, com produção máxima de 13,51 g.L⁻¹ de etanol, enquanto que as duas linhagens de *C. shehatae* produziram máximo de 8,87 g.L⁻¹ e 6,06 g.L⁻¹, respectivamente.

A fim de avaliar o efeito da adaptação de *P. stipitis* CBS 6054 ao hidrolisado hemicelulósico de palha de milho sem destoxificação no processo de fermentação para produção de etanol, Agbogbo et al. (2008) realizaram um estudo no qual promoveram a adaptação da levedura em meio líquido e sólido contendo 12,5% de hidrolisado e observaram que a adaptação das células ao hidrolisado sem destoxificação, tanto em meio líquido quanto sólido, promoveu maior consumo de açúcar e produção de etanol (95% e 25 g.L⁻¹, respectivamente).

Stoutenburg et al. (2011) avaliaram o potencial de fermentabilidade de hidrolisados hemicelulósicos, submetidos a diferentes processos de destoxificação (3 e 5% de carvão ativo, etilacetato, calagem com NaOH, troca iônica e filtro de esterilizar) por *P. stipitis* NRRL Y-7124 e a utilização de variantes adaptadas, tolerantes aos compostos inibidores. Nesse estudo, obtiveram melhores taxas de produção de etanol em todos os hidrolisados tratados, com concentrações entre 0,9 e 6,9 g.L⁻¹ comparados ao sem tratamento (0,4 g.L⁻¹). Quanto à adaptação das variantes de *P. stipitis*, as linhagens adaptadas promoveram altas concentrações de etanol (9,8 g.L⁻¹ ± 0,6 em 24 horas com hidrolisado sem tratamento) comparadas à linhagem selvagem, demonstrando a viabilidade de utilizar micro-organismos adaptados, a recorrer aos processos de tratamento dos hidrolisados.

A utilização da linhagem de *P. stipitis* BCRC21777 recém-adaptada ao hidrolisado de palha de arroz apresentou desempenho superior na fermentação (11,04 g.L⁻¹), comparado à linhagem selvagem (9,38 g.L⁻¹), tanto no hidrolisado sem e com destoxificação

(calagem com NaOH), alcançando um máximo de conversão de etanol de quase 87% (HUANG et al., 2009).

Yang et al. (2011) utilizaram uma linhagem adaptada de *P. stipitis* CBS6054 tolerante aos inibidores para a produção de etanol a partir de hidrolisado de talo de milho sem destoxificação e alcançaram uma de produção máxima de etanol de 32,04 g.L⁻¹ (meio contendo 5,34 g.L⁻¹ de furfural) e 32,38 g.L⁻¹ (meio contendo 4,14 g.L⁻¹ de furfural), enquanto que a linhagem original não produziu etanol nessas concentrações de furfural.

Esses estudos demonstram o potencial de adaptação de *P. stipitis* e a viabilidade do emprego dessa metodologia, visando melhorias no processo de fermentação e, conseqüentemente, no rendimento e na produtividade de etanol, considerando que os processos de destoxificação geram gastos e podem levar a perdas nos teores de açúcares dos substratos (EKEN-SARAÇOĞLU; ARSLAN, 2000).

Nesse aspecto, são importantes os estudos dos efeitos desses inibidores no metabolismo de diferentes espécies de micro-organismos, visando à seleção de micro-organismos mais tolerantes e eficientes às condições dos processos de fermentação. Até o momento, não se tem conhecimento de trabalhos na literatura sobre o efeito de inibidores na produção de etanol por *S. stipitis* ATCC 58376.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento foram utilizados o Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAETF) e o Laboratório de Análises Agro-Ambientais (LAAA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus Cascavel*.

A Figura 9 apresenta o fluxograma simplificado das etapas seguidas para a realização do experimento.

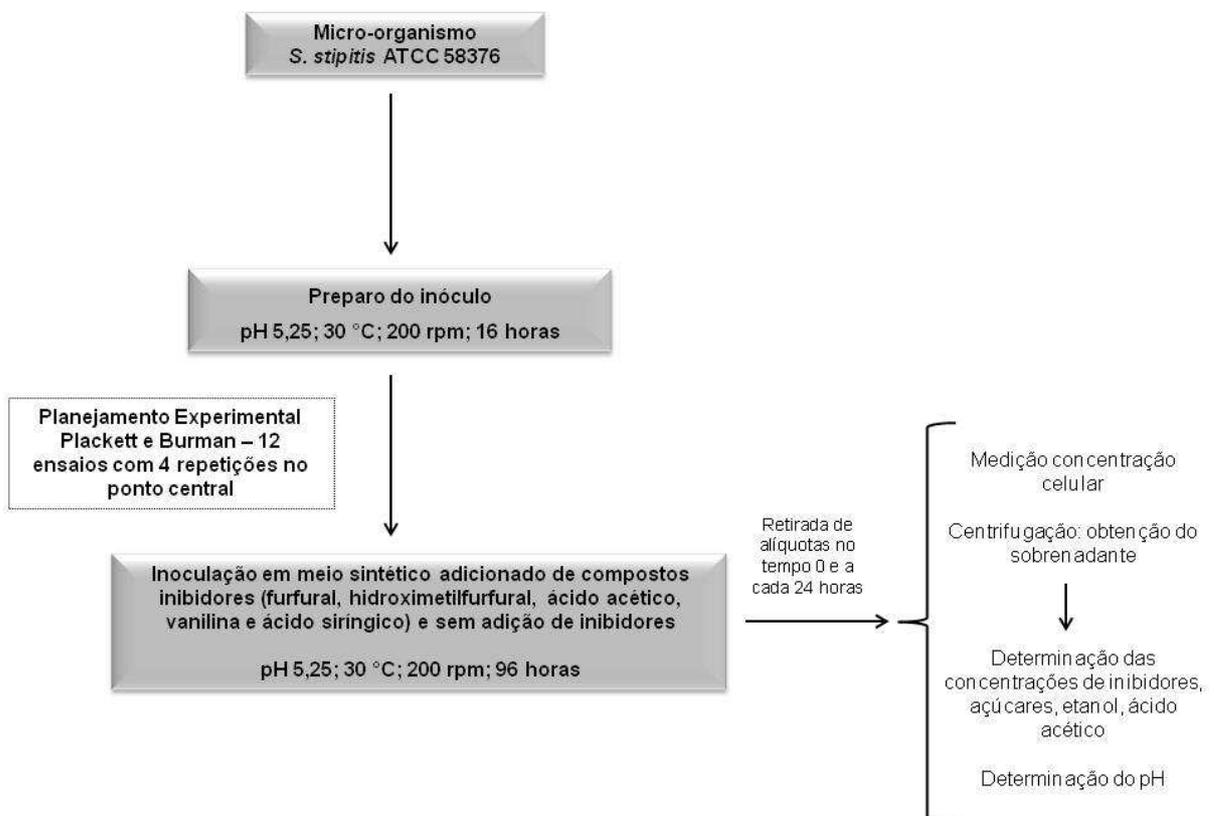


Figura 9 Fluxograma simplificado das etapas do experimento.

4.1 Micro-organismo

Neste trabalho, foi utilizada a linhagem de *S. stipitis* ATCC 58376, adquirida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, mantida em tubos com meio de cultura Yeast Malt Agar (YMA) a 4 °C, o qual contém em sua composição, extrato de malte (3,0 g.L⁻¹), extrato de levedura (3,0 g.L⁻¹), peptona (5,0 g.L⁻¹), dextrose (10,0 g.L⁻¹) e ágar (20,0 g.L⁻¹).

4.2 Preparo do inóculo

O inóculo da linhagem de *S. stipitis* foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio sintético, cuja composição apresenta-se na Tabela 1. Os frascos foram incubados em shaker (Marconi MA-420) sob agitação em movimento rotatório a 200 rpm, temperatura 30 °C por 16 horas. As células foram centrifugadas a 268,2 g por 20 minutos, lavadas com água destilada estéril e após nova centrifugação, ressuspensas em água destilada estéril e, então, utilizadas como inóculo.

Tabela 1 Composição do meio sintético utilizado para cultivo das células para o preparo do inoculo e para a realização dos ensaios de fermentação

Componente	Concentração em g.L ⁻¹
Glicose	5,0
Xilose	40,0
Peptona	6,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0

A concentração celular inicial nos ensaios foi medida por meio de uma curva padrão que correlaciona a densidade óptica a 600 nm com o peso seco das células e número de células obtido em Câmara de Neubauer.

4.3 Efeito da presença de inibidores na produção de etanol por *S. stipitis*

Foi avaliada a influência das variáveis (furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético, vanilina e ácido siríngico) sobre o crescimento celular e produção de etanol após 72 e 96 horas do processo fermentativo, empregando o planejamento fatorial Plackett e Burman (PB), cujos fatores e seus respectivos níveis estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Concentrações dos compostos inibidores adicionados ao meio sintético

Fatores	Código	-1	0	1
		g.L ⁻¹		
Furfural (F)	X1	0,025	0,05	0,75
Hidroximetilfurfural (HMF)	X2	0,01	0,02	0,03
Ácido acético (AA)	X3	2	4	6
Vanilina (V)	X4	0,03	0,06	0,09
Ácido siríngico (AS)	X5	0,025	0,05	0,75

O planejamento constou de 12 ensaios (7 ensaios a mais em relação ao número de variáveis independentes) e quatro ensaios no ponto central, totalizando 16 ensaios (Tabela 3). À parte, foram realizados ensaios controle (sem adição dos compostos tóxicos) com quatro repetições.

Tabela 3 Matriz de planejamento experimental de Plackett e Burman para 12 ensaios com 4 repetições no ponto central, utilizada para realização do experimento.

Ensaio	Valores codificados					Valores reais*				
	X1	X2	X3	X4	X5	Furfural (X1)	HMF (X2)	Ácido acético (X3)	Vanilina (X4)	Ácido síringico (X5)
1	1	-1	1	-1	-1	0,75	0,01	6	0,03	0,025
2	1	1	-1	1	-1	0,75	0,03	2	0,09	0,025
3	-1	1	1	-1	1	0,025	0,03	6	0,03	0,75
4	1	-1	1	1	-1	0,75	0,01	6	0,09	0,025
5	1	1	-1	1	1	0,75	0,03	2	0,09	0,75
6	1	1	1	-1	1	0,75	0,03	6	0,03	0,75
7	-1	1	1	1	-1	0,025	0,03	6	0,09	0,025
8	-1	-1	1	1	1	0,025	0,01	6	0,09	0,75
9	-1	-1	-1	1	1	0,025	0,01	2	0,09	0,75
10	1	-1	-1	-1	1	0,75	0,01	2	0,03	0,75
11	-1	1	-1	-1	-1	0,025	0,03	2	0,03	0,025
12	-1	-1	-1	-1	-1	0,025	0,01	2	0,03	0,025
13	0	0	0	0	0	0,05	0,02	4	0,06	0,05
14	0	0	0	0	0	0,05	0,02	4	0,06	0,05
15	0	0	0	0	0	0,05	0,02	4	0,06	0,05
16	0	0	0	0	0	0,05	0,02	4	0,06	0,05
Controle**	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Nota: *As concentrações dos compostos inibidores estão expressas em g.L⁻¹.

**Realizado com quatro repetições.

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 110 mL de meio sintético composto pelos açúcares e nutrientes descritos na Tabela 1, porém preparado com solução tampão em substituição à água destilada. Foram preparadas soluções concentradas de cada nutriente, as quais foram autoclavadas a 115 °C por 15 minutos e solução tampão de fosfato de potássio (KH₂PO₄ / K₂HPO₄) 0,6 M, pH 5,25, previamente autoclavada a 121 °C por 20 minutos. Após a mistura das soluções de açúcares e de nutrientes e a solução tampão, foram adicionados os compostos inibidores nas concentrações descritas na Tabela 3. Em seguida foi feita a inoculação e os frascos foram incubados em shaker sob agitação em movimento rotatório a 200 rpm, a 30 °C por um período de 96 horas, condições otimizadas por Tavares (2013).

Foram retiradas alíquotas de 3 mL de cada ensaio nos tempos inicial, 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação. Após medição da concentração celular, as amostras retiradas

foram centrifugadas a 268,2 g para separação das células e avaliação do pH do sobrenadante para posterior armazenamento a -20° C até o momento das análises de consumo de açúcares, inibidores e produção de etanol.

As concentrações de açúcares e inibidores foram definidas de acordo com valores encontrados em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar, segundo a literatura (CUNHA et al., 2006; ARRUDA, 2007), visto que o bagaço de cana-de-açúcar é a biomassa mais abundante e estudada para produção de etanol de segunda geração no Brasil.

Para as análises estatísticas foi utilizado o *software* computacional Statistica, versão 7.1 (STATSOFT INC, 2005). Foram consideradas como respostas (variáveis dependentes) do planejamento experimental o crescimento celular e a produção de etanol em 72 e 96 horas de fermentação.

4.4 Métodos analíticos

4.4.1 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético e etanol

Para quantificação de glicose, xilose, ácido acético e etanol, as amostras foram apropriadamente diluídas com água deionizada e posteriormente filtradas em filtros VertiPure™ PTFE (Politetrafluoretileno) Syringe Filters com abertura de poros de 0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro e analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo 20A) com detector de índice de refração, empregando coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8%); 150 x 7,8 mm. Como fase móvel foi utilizada solução de H₂SO₄ 0,005 N, filtrada a vácuo em membrana de acetato de celulose (0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro); fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura do forno 65 °C. Curvas de calibração foram obtidas para cada composto.

As concentrações de glicose, xilose e ácido acético foram determinadas a partir de curvas padrão obtidas com padrões de alta pureza (98-99%, SIGMA e VETEC) contendo sete pontos nas seguintes faixas de concentração: 0,15 – 1,5 g.L⁻¹.

4.4.2 Determinação da concentração de furfural, hidroximetilfurfural, ácido siríngico e vanilina

Para a determinação da concentração dos compostos tóxicos furfural (F), hidroximetilfurfural (HMF), ácido siríngico (AS) e vanilina (V), as amostras foram centrifugadas e posteriormente filtradas em filtros VertiPure™ PTFE (Politetrafluoretileno) Syringe Filters (0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro) para total remoção de partículas sólidas. O eluente foi filtrado a vácuo empregando-se membrana de acetato de celulose

(0,45 μm de poro e 47mm de diâmetro) e em seguida desgaseificado em banho de ultrassom (Microsonic SX-50) por 15 min.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido empregando as seguintes condições: coluna 100 C18 Kromasil, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm; temperatura do forno 30 °C; detector UV-VIS (SPD-20A) a 208 nm, fase móvel solução de acetonitrila/água na proporção (1:8) com 1% de ácido acético, fluxo de 0,8 mL.min⁻¹; volume da amostra injetada, 20 μL . As concentrações desses compostos foram determinadas a partir de curvas padrão obtidas com padrões de alta pureza (99%, SIGMA) contendo sete pontos nas seguintes faixas de concentração: 0,01 – 0,75 g.L⁻¹.

4.4.3 Determinação da concentração celular

O crescimento celular, expresso em g.L⁻¹, foi determinado através da medida da absorbância lida em espectrofotômetro a 600 nm, e a concentração celular calculada por uma curva padrão que correlaciona a absorbância e o peso seco das células e o número de células obtidas em câmara de Neubauer.

4.4.4 Determinação do pH

O pH do meio foi determinado utilizando um pH-metro Luthon pH206, após centrifugação das amostras.

4.5. Cálculo dos parâmetros fermentativos

4.5.1 Fator de conversão de açúcares totais consumido em etanol ($Y_{P/S}$)

O fator de conversão de xilose e glicose em etanol ($Y_{P/S}$), expresso em g.g⁻¹, foi determinado através da Equação 1:

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

Eq. (1)

onde:

P_i e P_f - Concentração inicial e final de etanol;

S_i e S_f - Concentração inicial e final de substrato (xilose+glicose).

4.5.2 Fator de conversão de açúcares totais em células ($Y_{X/S}$)

O fator de conversão de açúcares totais (xilose e glicose) em células ($Y_{X/S}$), expresso em g.g^{-1} , foi determinado através da Equação 2:

$$Y_{X/S} = \left(\frac{\Delta x}{-\Delta S} \right) = \left(\frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \right)$$

Eq. (2)

onde:

X_i e X_f - Concentração inicial e final de células;

S_i e S_f - Concentração inicial e final de substrato (xilose+glicose).

4.5.3 Produtividade volumétrica em etanol (Q_p)

A produtividade volumétrica em etanol (Q_p), expressa em g.L.h^{-1} , foi calculada através da Equação 3:

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

Eq. (3)

onde:

P_i e P_f - Concentração inicial e final de etanol;

t_i e t_f - Tempo inicial e final da fermentação.

4.5.4 Eficiência de conversão ($\eta\%$)

A eficiência de conversão de açúcares em etanol, expressa em%, foi calculada através da Equação 4:

$$\eta = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} * 100 * 0,511$$

Eq. (4)

onde:

P_i e P_f - Concentração inicial e final de etanol;

S_i e S_f - Concentração inicial e final de substrato (xilose+glicose);

0,511 - Rendimento teórico em etanol.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito de compostos inibidores sobre o crescimento celular, o consumo de açúcares e a produção de etanol por *S. stipitis* ATCC 58376

5.1.1 Crescimento celular

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para crescimento celular após 72 e 96 horas do cultivo de *S. stipitis* ATCC 58376 na presença de diferentes concentrações de compostos inibidores. Observa-se que o crescimento foi afetado pelos compostos inibidores de acordo com as condições dos ensaios.

Tabela 4 Matriz do planejamento Plackett e Burman 12 contendo os resultados obtidos para crescimento celular após 72 e 96 horas do cultivo de *S. stipitis* ATCC 58376 na presença de compostos inibidores adicionados em meio sintético

Ensaio	Fatores ^a					Concentração celular (g.L ⁻¹) após 72 horas	Concentração celular (g.L ⁻¹) após 96 horas
	Furfural	HMF	Ácido acético	Vanilina	Ácido siríngico		
E01	0,75	0,01	6,0	0,03	0,025	0,49	0,4
E02	0,75	0,03	2,0	0,09	0,025	3,78	3,44
E03	0,025	0,03	6,0	0,03	0,75	1,44	1,97
E04	0,75	0,01	6,0	0,09	0,025	0,28	0,28
E05	0,75	0,03	2,0	0,09	0,75	1,81	2,83
E06	0,75	0,03	6,0	0,03	0,75	0,49	0,45
E07	0,025	0,03	6,0	0,09	0,025	0,35	0,32
E08	0,025	0,01	6,0	0,09	0,75	1,32	1,88
E09	0,025	0,01	2,0	0,09	0,75	3,89	3,73
E10	0,75	0,01	2,0	0,03	0,75	3,56	3,54
E11	0,025	0,03	2,0	0,03	0,025	3,03	4,37
E12	0,025	0,01	2,0	0,03	0,025	2,97	3,76
E13*	0,05	0,02	4,0	0,06	0,05	2,14	3,30
E14*	0,05	0,02	4,0	0,06	0,05	1,89	3,12
E15*	0,05	0,02	4,0	0,06	0,05	1,21	1,64
E16*	0,05	0,02	4,0	0,06	0,05	1,81	2,84
Controle**	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,62	3,34
DP***	-	-	-	-	-	0,05	0,11

^aConcentrações em g.L⁻¹; *Pontos centrais (PC); **Médias de 4 repetições; ***DP: Desvio-padrão.

A Figura 10 mostra a cinética de crescimento celular de *S. stipitis* na presença de diferentes concentrações de furfural (0,025; 0,05 e 0,75 g.L⁻¹), HMF (0,01; 0,02 e 0,03 g.L⁻¹), ácido acético (2,0, 4,0 e 6,0 g.L⁻¹), vanilina (0,03; 0,06; 0,09 g.L⁻¹) e ácido siríngico (0,025; 0,05 e 0,75 g.L⁻¹) adicionados ao meio sintético, bem como no experimento controle (sem inibidores) ao longo de 96 horas. Observa-se que o crescimento celular foi prejudicado nos

ensaios 01, 03, 04, 05, 06, 07, 08 e PC, sendo que nos ensaios 01, 04, 06 e 07 não houve aumento de biomassa ao longo de todo o processo de fermentação.

Nos ensaios 03, 05, 08 e Ponto central (PC) o crescimento foi lento nas primeiras 24 horas, sendo que nos ensaios 03 e 08 a concentração celular final foi de 1,97 e 1,88 g.L⁻¹. Os demais ensaios (02, 09, 10, 11 e 12) apresentaram concentrações celulares entre 1,18 e 1,96 g.L⁻¹ em 24 horas, sendo valores baixos de crescimento quando comparados ao controle (sem compostos inibidores), que foi de 4,1 g.L⁻¹.

A inibição do crescimento celular é relatada em vários estudos que avaliaram o efeito de compostos inibidores no cultivo de micro-organismos, como *P.stipitis* NRRLY-7124 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 211239 (LIU et al., 2004); *Candida guilliermondii* (CORTEZ; ROBERTO, 2010), assim como o prolongamento da fase lag (KELLY et al., 2008; KWON et al., 2011).

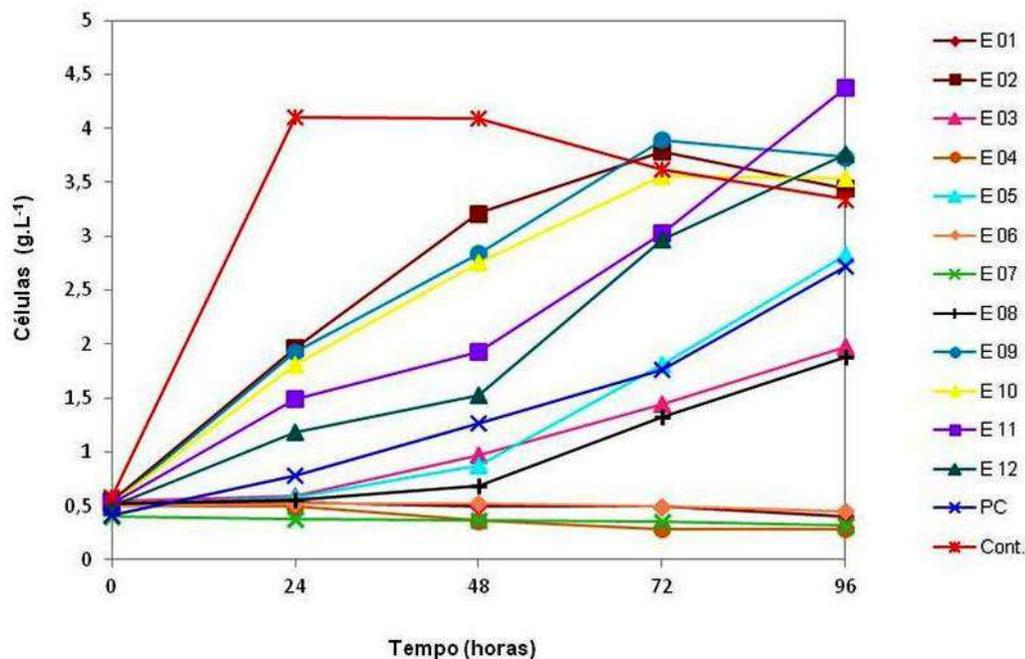


Figura 10 Crescimento celular da levedura *S. stipitis* durante o cultivo em meio sintético adicionado de compostos inibidores e sem inibidores.

Nota: *Concentrações de inibidores (g.L⁻¹) em cada ensaio: **E01** (F: 0,75; HMF: 0,01; AA: 6,0; V: 0,03; AS: 0,025); **E02** (F: 0,75; HMF: 0,03; AA: 2,0; V: 0,09; AS: 0,025); **E03** (F: 0,025; HMF: 0,03; AA: 6,0; V: 0,03; AS: 0,75); **E04** (F: 0,75; HMF: 0,01; AA: 6,0; V: 0,09; AS: 0,025); **E05** (F: 0,75; HMF: 0,03; AA: 2,0; V: 0,09; AS: 0,75); **E06** (F: 0,75; HMF: 0,03; AA: 6,0; V: 0,03; AS: 0,75); **E07** (F: 0,025; HMF: 0,03; AA: 6,0; V: 0,09; AS: 0,025); **E08** (F: 0,025; HMF: 0,01; AA: 6,0; V: 0,09; AS: 0,75); **E09** (F: 0,025; HMF: 0,01; AA: 2,0; V: 0,09; AS: 0,75); **E10** (F: 0,75; HMF: 0,01; AA: 2,0; V: 0,03; AS: 0,75); **E11** (F: 0,025; HMF: 0,03; AA: 2,0; V: 0,03; AS: 0,025); **E12** (F: 0,025; HMF: 0,01; AA: 2,0; V: 0,03; AS: 0,025) **PC** (Ponto central) (F: 0,05; HMF: 0,02; AA: 4,0; V: 0,06; AS: 0,05); **Cont.** (sem inibidores).

Após as 48 horas, a maioria dos ensaios apresentou aumento de biomassa, exceto o ensaio controle, no qual se observou um decréscimo de 4,09 para 3,34 g.L⁻¹, ao final de 96 horas. É importante notar que nos ensaios com 2,0 g.L⁻¹ de ácido acético, a presença deste ácido favoreceu o crescimento celular, comparado ao ensaio controle (sem inibidores).

Os mecanismos de inibição do crescimento celular devido à presença de compostos tóxicos estão relacionados às alterações de pH intracelular, de membranas celulares e enzimáticas, levando a interferências no consumo de açúcares e na produção de energia (PALMQVIST et al., 1999; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A partir de 72 horas o crescimento celular manteve-se constante (ensaios 02, 09 e 10), sendo que máximos valores foram obtidos nos ensaios 09 ($3,89 \text{ g.L}^{-1}$), 02 ($3,78 \text{ g.L}^{-1}$) e ensaio 10 ($3,56 \text{ g.L}^{-1}$), enquanto que nos ensaios 11, 12 e PC os valores máximos ($4,37$ e $3,76$ e $2,72 \text{ g.L}^{-1}$) foram observados em 96 horas. No ensaio controle verificou-se um decréscimo, provavelmente devido ao rápido crescimento em 24 horas e a partir desse momento pode ter havido floculação e precipitação das células.

5.1.2 Consumo de açúcares

Na Figura 11 (A e B) é possível observar que a presença de compostos inibidores afetou o consumo de açúcares, tanto glicose como xilose, na maioria dos ensaios, quando comparado ao ensaio controle (sem inibidores).

Verificou-se que nos ensaios 01, 04, 06 e 07 o consumo de glicose variou entre 11,05 e 18,30% em 96 horas de fermentação. No ensaio 05, verificou-se 100% de consumo após 72 horas, enquanto que nos ensaios 03 e 08 o consumo total foi observado em 96 horas e no ensaio 12 em 48 horas. No ensaio 02 ($0,75 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural; $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF; $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético; $0,09 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina e $0,025 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido siríngico), ensaio 09 ($0,025 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural; $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF; $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético; $0,09 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina e $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido siríngico), ensaio 10 ($0,75 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural; $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF; $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético; $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina e $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido siríngico), ensaio 11 ($0,025 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural; $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF; $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético; $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina e $0,025 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido siríngico) e ensaio PC ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural; $0,02 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF; $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético; $0,06 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina e $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido siríngico) observou-se o consumo total (100%) em 24 horas, assim como no ensaio controle (sem inibidores), o que indica que a presença de inibidores (furfural, HMF, ácido acético, vanilina e ácido siríngico) até certo limite, não prejudica o consumo deste açúcar. É comum observar o consumo preferencial de glicose em relação à xilose, como observaram Agbogbo et al. (2006); porém, nos experimentos deste trabalho isso não foi observado.

Em relação ao consumo de xilose, os ensaios 01, 03, 04, 06, 07 e 08, os quais continham 6 g.L^{-1} de ácido acético além dos demais inibidores, apresentaram consumo de somente 11,60; 4,52; 11,07; 10,36; 7,65 e 7,06% após 96 horas. A maior velocidade de consumo foi verificada no ensaio controle (sem inibidores), ou seja, de 100% nas primeiras 48 horas. No ensaio 02 ($0,75 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural; $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF; $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético; $0,09 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina e $0,025 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido siríngico) verificou-se o consumo total (100%)

em 72 horas, enquanto que nos ensaios 09, 10 e 11, o consumo de 100% ocorreu em 96 horas.

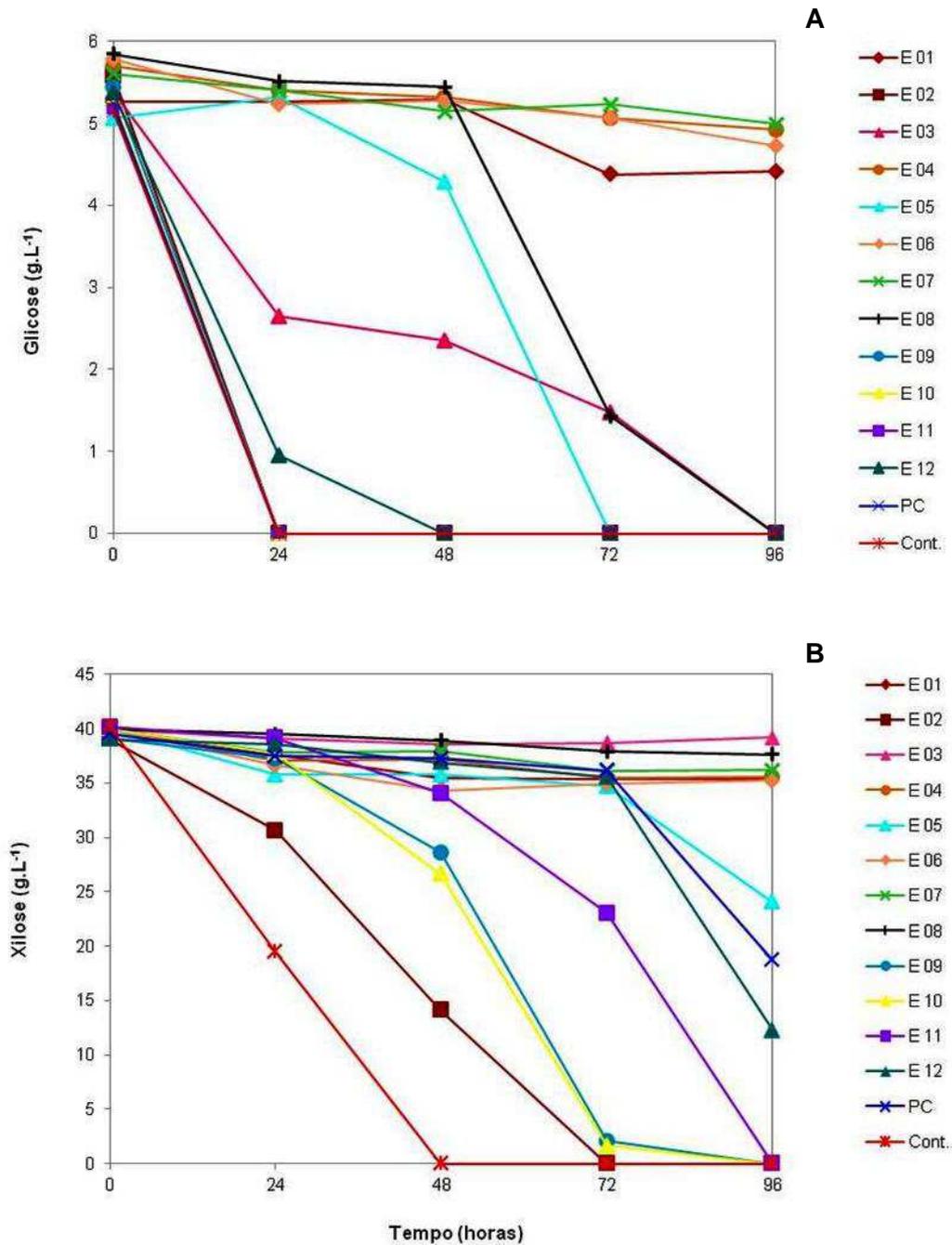


Figura 11 Consumo de glicose (A) e xilose (B) durante o cultivo de *S. stipitis* em meio sintético adicionado de compostos inibidores e sem inibidores.

Nota: *Concentrações de inibidores (g.L^{-1}) em cada ensaio: **E01** (F: 0,75; HMF: 0,01; AA: 6,0; V: 0,03; AS: 0,025); **E02** (F: 0,75; HMF: 0,03; AA: 2,0; V: 0,09; AS: 0,025); **E03** (F: 0,025; HMF: 0,03; AA: 6,0; V: 0,03; AS: 0,75); **E04** (F: 0,75; HMF: 0,01; AA: 6,0; V: 0,09; AS: 0,025); **E05** (F: 0,75; HMF: 0,03; AA: 2,0; V: 0,09; AS: 0,75); **E06** (F: 0,75; HMF: 0,03; AA: 6,0; V: 0,03; AS: 0,75); **E07** (F: 0,025; HMF: 0,03; AA: 6,0; V: 0,09; AS: 0,025); **E08** (F: 0,025; HMF: 0,01; AA: 6,0; V: 0,09; AS: 0,75); **E09** (F: 0,025; HMF: 0,01; AA: 2,0; V: 0,09; AS: 0,75); **E10** (F: 0,75; HMF: 0,01; AA: 2,0; V: 0,03; AS: 0,75); **E11** (F: 0,025; HMF: 0,03; AA: 2,0; V: 0,03; AS: 0,025); **E12** (F: 0,025; HMF: 0,01; AA: 2,0; V: 0,03; AS: 0,025) **PC** (Ponto central) (F: 0,05; HMF: 0,02; AA: 4,0; V: 0,06; AS: 0,05); **Cont.** (sem inibidores).

No ensaio 05 (0,75 g.L⁻¹ de furfural; 0,03 g.L⁻¹ de HMF; 2,0 g.L⁻¹ de ácido acético; 0,09 g.L⁻¹ de vanilina e 0,75 g.L⁻¹ de ácido siríngico), ensaio 12 (0,025 g.L⁻¹ de furfural; 0,01 g.L⁻¹ de HMF; 2,0 g.L⁻¹ de ácido acético; 0,03 g.L⁻¹ de vanilina e 0,025 g.L⁻¹ de ácido siríngico) e ensaio PC (0,05 g.L⁻¹ de furfural; 0,02 g.L⁻¹ de HMF; 4,0 g.L⁻¹ de ácido acético; 0,06 g.L⁻¹ de vanilina e 0,05 g.L⁻¹ de ácido siríngico) verificou-se que em 96 horas de fermentação a assimilação não foi completa, sendo respectivamente de 39,85; 69,05 e 52,66%. No ensaio 02 (0,75 g.L⁻¹ furfural; 0,03 g.L⁻¹ HMF; 2,0 g.L⁻¹ ácido acético; 0,09 g.L⁻¹ vanilina e 0,025 g.L⁻¹ ácido siríngico), que apresentou o mais rápido consumo de xilose (72 horas), verificou-se também que a glicose se esgotou rapidamente (24 horas), comportamento semelhante ao observado no ensaio controle (sem inibidores) que teve o mais rápido consumo.

Bellido et al. (2011) também observaram que os compostos tóxicos ácido acético (0,5-1,5 g.L⁻¹), furfural e HMF (0,15 e 0,05 g.L⁻¹, respectivamente) adicionados em meio sintético interferiram no consumo de açúcares, durante o cultivo de *P. stipitis* DSM 3651, no qual houve um atraso no consumo de glicose (concentração inicial 35 g.L⁻¹) e inibição do consumo de xilose (concentração inicial 20 g.L⁻¹). Mussato; Dragone e Roberto (2005) verificaram que os compostos tóxicos (ácido acético, furfural, HMF, vanilina, ácido siríngico, siringaldeído e ácido ferúlico) presentes em hidrolisados hemicelulósicos prejudicaram principalmente o consumo de xilose por *C. guilliermondii* FTI 20037, enquanto que o consumo de glicose não foi afetado, ao contrário do que ocorreu no presente trabalho.

5.1.3 Produção de etanol

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos para produção de etanol após 72 e 96 horas do cultivo de *S. stipitis* ATCC 58376 na ausência e na presença de diferentes concentrações de compostos inibidores. Verifica-se que esse parâmetro foi afetado negativamente pela adição dos compostos inibidores, de acordo com a condição de cada ensaio.

Tabela 5 Matriz do planejamento Plackett e Burman 12 contendo os resultados obtidos para produção de etanol após 72 e 96 horas do cultivo de *S. stipitis* ATCC 58376 na presença de compostos inibidores adicionados em meio sintético e sem inibidores

Ensaio	Fatores ^a					Variáveis respostas	
	Furfural	HMF	Ácido acético	Vanilina	Ácido siríngico	Concentração de etanol (g.L ⁻¹) após 72 horas	Concentração de etanol (g.L ⁻¹) após 96 horas
E01	0,75	0,01	6,0	0,03	0,025	0,0	0,0
E02	0,75	0,03	2,0	0,09	0,025	10,75	7,57
E03	0,025	0,03	6,0	0,03	0,75	0,0	0,0
E04	0,75	0,01	6,0	0,09	0,025	0,0	0,0
E05	0,75	0,03	2,0	0,09	0,75	2,33	3,3
E06	0,75	0,03	6,0	0,03	0,75	0,0	0,0
E07	0,025	0,03	6,0	0,09	0,025	0,0	0,0
E08	0,025	0,01	6,0	0,09	0,75	0,0	0,0
E09	0,025	0,01	2,0	0,09	0,75	14,3	8,57
E10	0,75	0,01	2,0	0,03	0,75	12,43	7,55
E11	0,025	0,03	2,0	0,03	0,025	7,95	8,04
E12	0,025	0,01	2,0	0,03	0,025	3,3	7,42
E13*	0,05	0,02	4,0	0,06	0,05	4,20	9,93
E14*	0,05	0,02	4,0	0,06	0,05	3,42	9,08
E15*	0,05	0,02	4,0	0,06	0,05	3,46	8,31
E16*	0,05	0,02	4,0	0,06	0,05	3,80	8,05
Controle**	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,5	11,68
DP***	-	-	-	-	-	3,04	3,90

^aConcentrações em g.L⁻¹; *Pontos centrais (PC); **Médias de 4 repetições; ***DP: desvio padrão.

O perfil cinético da produção de etanol, exibido na Figura 12 mostra o efeito negativo da presença de compostos inibidores nos ensaios 01, 03, 04, 06, 07 e 08, nos quais não houve produção de etanol. Nas primeiras 24 horas é possível observar produção de etanol nos ensaios 02, 09, 10 e 11, assim como no ensaio controle (sem inibidor), no qual a concentração final obtida foi de 11,68 g.L⁻¹ em 96 horas. Nos ensaios 12 e PC a produção iniciou a partir de 24 horas, alcançando concentrações máximas de 7,42 e 8,45 g.L⁻¹, respectivamente, ao final do processo (96 horas).

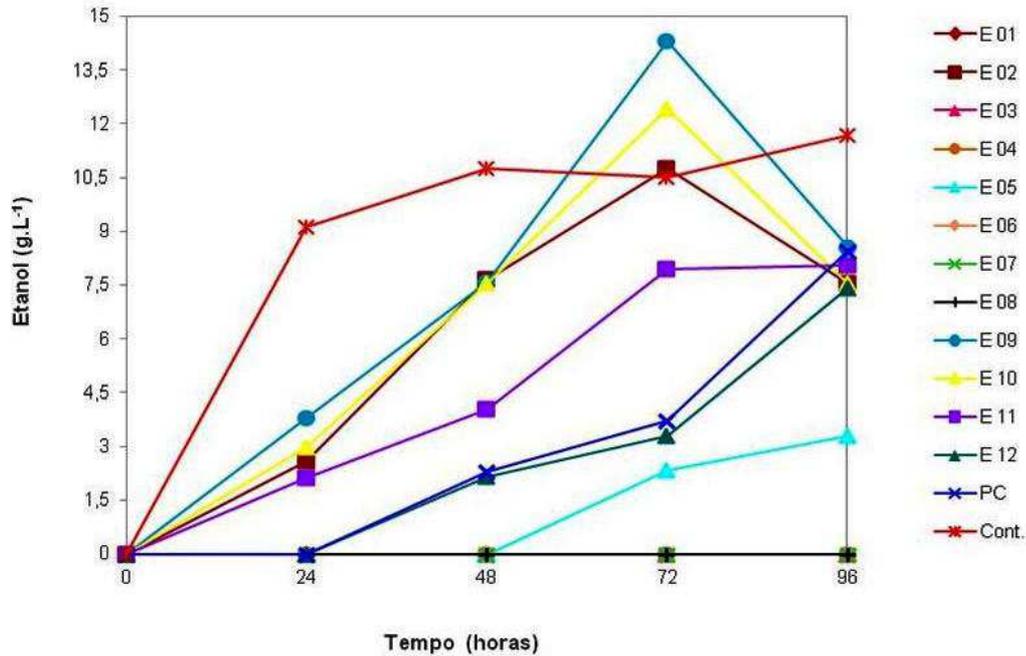


Figura 12 Produção de etanol durante o cultivo de *S. stipitis* em meio sintético adicionado de compostos inibidores e sem inibidores.

Nota: *Concentrações de inibidores (g.L⁻¹) em cada ensaio: **E01** (F: 0,75; HMF: 0,01; AA: 6,0; V: 0,03; AS: 0,025); **E02** (F: 0,75; HMF: 0,03; AA: 2,0; V: 0,09; AS: 0,025); **E03** (F: 0,025; HMF: 0,03; AA: 6,0; V: 0,03; AS: 0,75); **E04** (F: 0,75; HMF: 0,01; AA: 6,0; V: 0,09; AS: 0,025); **E05** (F: 0,75; HMF: 0,03; AA: 2,0; V: 0,09; AS: 0,75); **E06** (F: 0,75; HMF: 0,03; AA: 6,0; V: 0,03; AS: 0,75); **E07** (F: 0,025; HMF: 0,03; AA: 6,0; V: 0,09; AS: 0,025); **E08** (F: 0,025; HMF: 0,01; AA: 6,0; V: 0,09; AS: 0,75); **E09** (F: 0,025; HMF: 0,01; AA: 2,0; V: 0,09; AS: 0,75); **E10** (F: 0,75; HMF: 0,01; AA: 2,0; V: 0,03; AS: 0,75); **E11** (F: 0,025; HMF: 0,03; AA: 2,0; V: 0,03; AS: 0,025); **E12** (F: 0,025; HMF: 0,01; AA: 2,0; V: 0,03; AS: 0,025) **PC** (Ponto central) (F: 0,05; HMF: 0,02; AA: 4,0; V: 0,06; AS: 0,05); **Cont.** (sem inibidores).

Kwon et al. (2011) observaram que a presença de compostos tóxicos em meio sintético afetou a produção de etanol por *Issatchenkia orientalis*; o mesmo ocorreu com *P. stipitis* NRRLY-7124 após a adição de ácido acético (6,9 g.L⁻¹), furfural (0,15 g.L⁻¹) e derivados da lignina em mistura com máxima produção etanol de 2,4 g.L⁻¹ e no controle (sem inibidores) de 22,3 g.L⁻¹ (NIGAM, 2001). Lee et al. (2013) que observaram a inibição da produção de etanol por *P. stipitis* CBS 6054 a partir de hidrolisado hemicelulósico de madeira macia não destoxificado (sem remoção de compostos tóxicos).

No presente trabalho, a máxima concentração de etanol foi obtida no ensaio 09 (14,3 g.L⁻¹), seguido do ensaio 10 (12,43 g.L⁻¹) e 02 (10,75 g.L⁻¹), os quais foram superiores ao controle (sem inibidores), em 72 horas de fermentação. Canilha et al. (2010) obtiveram concentrações máximas de etanol de 7,5 g.L⁻¹ utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado (redução dos inibidores), enquanto que no hidrolisado sem destoxificar (sem remoção ou redução dos inibidores), a máxima produção foi de 4,5 g.L⁻¹ em 120 horas de cultivo de *P. stipitis* DSM 3651. Após destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos de madeira macia, Lee et al. (2013) verificaram máximas concentrações de etanol após 48 horas (10,12 g.L⁻¹) e 72 horas (9,36 g.L⁻¹) a partir de 27,78 g.L⁻¹ de açúcares fermentáveis.

Ao analisar o perfil cinético das fermentações, observa-se que houve um decréscimo na concentração de etanol nos ensaios 02, 09 e 10, a partir de 72 horas, que coincidiu com o esgotamento dos açúcares no meio, indicando que a *S. stipitis* provavelmente utilizou o etanol como fonte de carbono. O estudo com a levedura *Pachysolen tannophilus* mostrou que esta pode consumir o etanol produzido como fonte de carbono após assimilação de açúcares do meio (KIIPPER, 2009).

5.1.3 Concentração de ácido acético e avaliação do pH

O perfil cinético apresentado na Figura 13 (A) mostra a variação das concentrações de ácido acético ao longo de 96 horas. Observa-se que em todos os ensaios, exceto o controle, ao qual não foi adicionado o ácido acético, este foi utilizado pela *S. stipitis* como fonte de carbono. Camargo e Sene (2013) observaram o consumo de ácido acético durante o cultivo de *S. stipitis* ATCC 58376 em hidrolisado de farelo de girassol contendo $0,13 \text{ g.L}^{-1}$ do ácido; esse comportamento também foi observado em *D. hansenii* UFV-170 por Sampaio et al. (2007) a partir de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético adicionado em meio semissintético. Dentre os ensaios contendo $6,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido, observou-se maior consumo nos ensaios 08 e 03, sendo 46,3 e 42,6%, respectivamente. Porém, não foi observada influência desse consumo no metabolismo, bem como nos parâmetros fermentativos no cultivo de *S. stipitis* ATCC 58376, assim como no metabolismo e demais parâmetros obtidos no cultivo de *D. hansenii* UFV-170 (SAMPAIO et al., 2007). No ensaio PC, no presente trabalho, que continha $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético, a assimilação desse ácido foi de 63,2%, em média.

Nos ensaios 02, 09, 10, 11 e 12, os quais continham $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético, observou-se assimilação total deste ácido ao longo de 96 horas de cultivo. Zeferino (2013) obteve comportamento semelhante com *P. stipitits* NRRL Y-7124, no qual o ácido acético foi completamente consumido quando em concentração inicial menor ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$).

A Figura 13 (B) mostra o comportamento do pH ao longo da fermentação, o qual apresentou pouca variação em relação ao valor inicial em todos os ensaios pelo fato do meio ter sido preparado com solução tamponada. Observa-se que o aumento do pH coincide com o decréscimo do ácido acético no meio, situação observada por Camargo e Sene (2013) durante a fermentação de hidrolisado de farelo de girassol pela mesma levedura utilizada no presente estudo. Segundo Agbogbo e Wenger (2007) e Sene et al. (2011), o aumento do pH está relacionado com o consumo de ácido acético pela levedura.

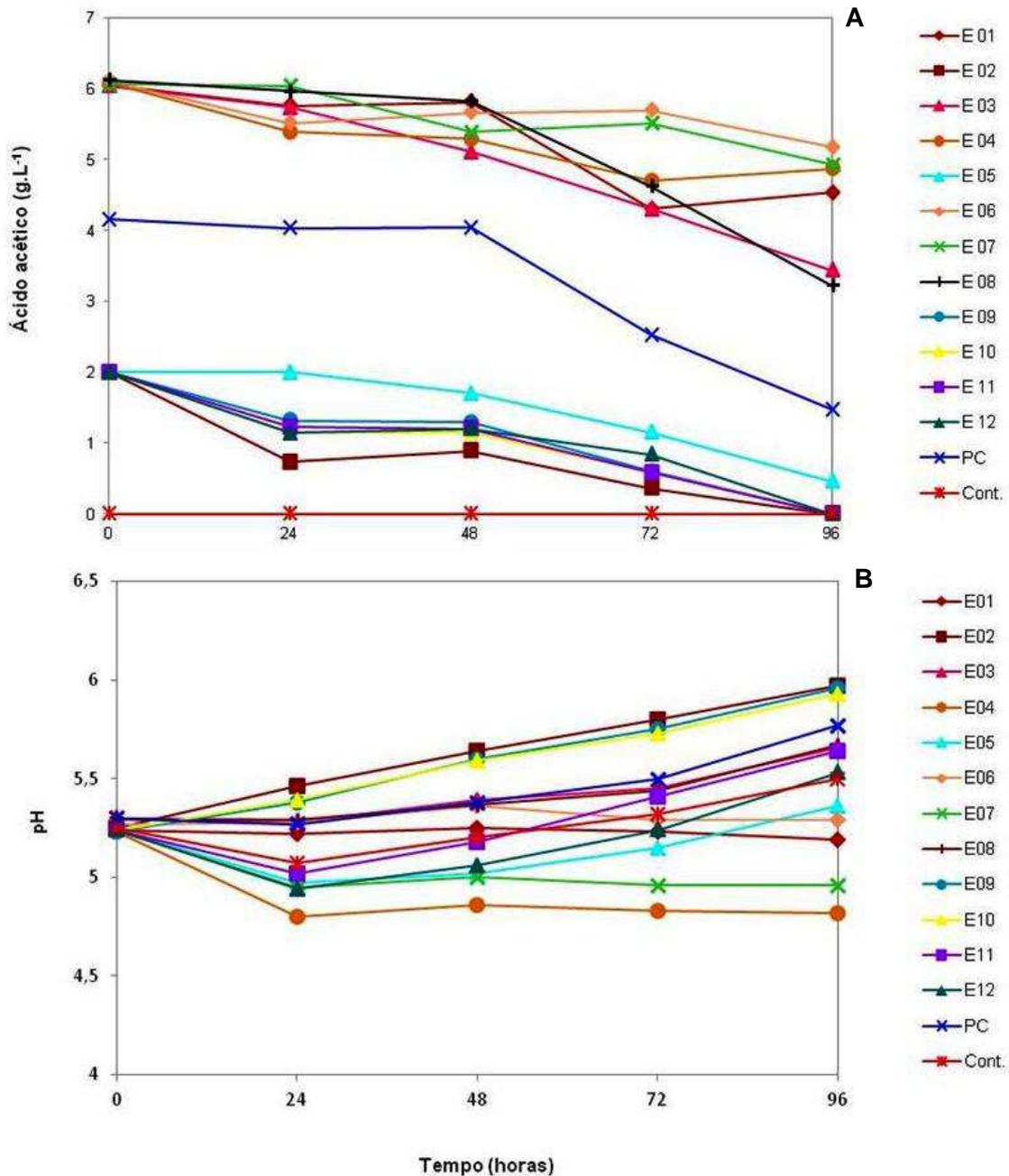


Figura 13 Variação nas concentrações de ácido acético (A) e nos valores de pH (B) durante o cultivo de *S. stipitis* em meio sintético.

Nota: *Concentrações de inibidores (g.L⁻¹) em cada ensaio: **E01** (F: 0,75; HMF: 0,01; AA: 6,0; V: 0,03; AS: 0,025); **E02** (F: 0,75; HMF: 0,03; AA: 2,0; V: 0,09; AS: 0,025); **E03** (F: 0,025; HMF: 0,03; AA: 6,0; V: 0,03; AS: 0,75); **E04** (F: 0,75; HMF: 0,01; AA: 6,0; V: 0,09; AS: 0,025); **E05** (F: 0,75; HMF: 0,03; AA: 2,0; V: 0,09; AS: 0,75); **E06** (F: 0,75; HMF: 0,03; AA: 6,0; V: 0,03; AS: 0,75); **E07** (F: 0,025; HMF: 0,03; AA: 6,0; V: 0,09; AS: 0,025); **E08** (F: 0,025; HMF: 0,01; AA: 6,0; V: 0,09; AS: 0,75); **E09** (F: 0,025; HMF: 0,01; AA: 2,0; V: 0,09; AS: 0,75); **E10** (F: 0,75; HMF: 0,01; AA: 2,0; V: 0,03; AS: 0,75); **E11** (F: 0,025; HMF: 0,03; AA: 2,0; V: 0,03; AS: 0,025); **E12** (F: 0,025; HMF: 0,01; AA: 2,0; V: 0,03; AS: 0,025) **PC** (Ponto central) (F: 0,05; HMF: 0,02; AA: 4,0; V: 0,06; AS: 0,05); **Cont.** (sem inibidores).

5.1.4 Parâmetros fermentativos da produção de etanol

Na Tabela 6 estão apresentados os parâmetros fermentativos obtidos após 72 horas de cultivo de *S. stipitis* em meio sintético adicionado de diferentes concentrações de compostos inibidores furfural (0,025; 0,05 e 0,75 g.L⁻¹), HMF (0,01; 0,02 e 0,03 g.L⁻¹), ácido acético (2,0; 4,0 e 6,0 g.L⁻¹), vanilina (0,03; 0,06; 0,09 g.L⁻¹) e ácido siríngico (0,025; 0,05 e 0,75 g.L⁻¹). É possível verificar que os parâmetros fermentativos foram afetados pelos compostos inibidores nos ensaios 01, 03, 04, 06, 07 e 08, nos quais o crescimento celular foi inibido ou reduzido e houve inibição ou retardo do consumo de açúcares, com consequente inibição da produção etanol.

Com relação ao fator de conversão de açúcares totais em etanol ($Y_{P/S}$ g.g⁻¹), verifica-se que o maior valor foi obtido nos ensaios PC (0,42 g.g⁻¹), seguido pelos ensaios 11 e 12 (0,35 g.g⁻¹, para ambos) e pelos ensaios 09 (0,33 g.g⁻¹) e 10 (0,29 g.g⁻¹), sendo estes valores superiores ao obtido no ensaio controle. Ressalta-se que os ensaios PC, 11, 12, 09 e 10 continham 0,05; 0,025 e 0,75 g.L⁻¹ de furfural; 0,02; 0,03; 0,01 g.L⁻¹ de HMF; 4,0 e 2,0 g.L⁻¹ de ácido acético; 0,06; 0,03; 0,09 e 0,03 g.L⁻¹ de vanilina e 0,05; 0,025 e 0,075 g.L⁻¹ de ácido siríngico. No trabalho realizado por Zeferino (2013), a baixa produção de etanol ocorreu com um menor consumo de açúcares, comparado ao controle, levando a um aumento nos valores do fator de conversão.

Bellido et al. (2011) também verificaram valor de $Y_{P/S}$ superior ao controle a partir do cultivo de *P. stipitis* DSM 3651 na presença de diferentes concentrações dos compostos ácido acético (1,5 g.L⁻¹), furfural (0,15 g.L⁻¹) e HMF (0,05 g.L⁻¹) em mistura e em concentrações iniciais de açúcares (glicose 23,77 g.L⁻¹; xilose 11,29 g.L⁻¹) adicionados em meio sintético, e obtiveram valor de 0,46 g.g⁻¹ em 168 horas.

Em relação ao fator de conversão de açúcares totais em células ($Y_{X/S}$ g.g⁻¹), os maiores valores foram observados nos ensaios 12 (0,26 g.g⁻¹), seguido pelo ensaio PC (0,15 g.g⁻¹), sendo superiores ao ensaio controle. Porém, os ensaios 11, 09 e 10 não se destacaram, quando comparados aos demais ensaios, apresentando valores muito próximos, mas superiores ao ensaio controle.

Quanto à produtividade volumétrica em etanol (Q_P g.L⁻¹.h), verifica-se melhor desempenho no ensaio 09 (0,19 g.L⁻¹.h), seguido pelos ensaios 10, 02 (0,15 g.L⁻¹.h) e ensaio 11 (0,11-0,17 g.L⁻¹.h), sendo próximos do valor obtido no ensaio controle (0,14 g.L⁻¹.h). A eficiência de conversão de açúcares em etanol ($\eta\%$) foi maior no ensaio PC (82,2%), seguido dos ensaios 11 e 12 com 68,5% para ambos, ensaio 09 (64,6%) e o ensaio 10 (56,7%), sendo valores superiores ao obtido no ensaio controle.

Alguns dos valores obtidos neste estudo são semelhantes ou próximos aos encontrados por Canilha et al. (2010), em cultivo de *P.stipitis* DSM 3651 a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol. Os autores utilizaram hidrolisados sem destoxificar e após diferentes métodos de destoxificação. A partir de hidrolisado sem destoxificação contendo ácido acético ($2,7 \text{ g.L}^{-1}$), HMF ($0,04 \text{ g.L}^{-1}$) e furfural ($0,3 \text{ g.L}^{-1}$) foram obtidos valores de $Y_{P/S}$ $0,20 \text{ g.g}^{-1}$, $Y_{X/S}$ $0,21 \text{ g.g}^{-1}$ e Q_P $0,04 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}$ em 120 horas. Após a destoxificação, os valores alcançados foram superiores: $Y_{P/S}$ $0,30 \text{ g.g}^{-1}$, $Y_{X/S}$ $0,27$ e 37 g.g^{-1} e Q_P $0,13$ e $0,16 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}$, também em 120 horas.

Nigam (2001) avaliou o efeito da adição em mistura de ácido acético ($6,9 \text{ g.L}^{-1}$), furfural ($0,15 \text{ g.L}^{-1}$) e derivados da lignina em meio sintético (45 g.L^{-1} de xilose e $6,4 \text{ g.L}^{-1}$ glicose) na produção de etanol por *P. stipitis*. NRRL Y-7124 e verificou que os parâmetros fermentativos foram afetados quando comparados ao controle (sem inibidores), no qual o valor obtido para $Y_{P/S}$ foi $0,11 \text{ g.g}^{-1}$; Q_P foi de $0,11 \text{ g. L}^{-1}.\text{h}$ e a eficiência de conversão ($\eta\%$) foi de $21,6\%$, após 120 horas. No controle, o desempenho foi melhor: $Y_{P/S} = 0,43 \text{ g.g}^{-1}$; $Q_P = 0,66 \text{ g. L}^{-1}.\text{h}$ e $\eta\% = 84,3\%$.

Tabela 6 Parâmetros fermentativos da produção de etanol pela levedura *S. stipitis* ATCC 58376 durante o cultivo em meio sintético adicionado de diferentes concentrações de compostos inibidores, após 72 horas

Ensaio	$Y_{P/S} (\text{g.g}^{-1})$ glicose + xilose	$Y_{X/S} (\text{g.g}^{-1})$ glicose+xilose	$Q_P (\text{g.L}^{-1}.\text{h})$	Eficiência% (η)
E01	0,00	0,00	0,00	0,0
E02	0,23	0,07	0,15	45,0%
E03	0,00	0,14	0,00	0,0
E04	0,00	0,00	0,00	0,0
E05	0,22	0,12	0,03	43,0%
E06	0,00	0,00	0,00	0,0
E07	0,00	0,00	0,00	0,0
E08	0,00	0,10	0,00	0,0
E09	0,33	0,07	0,19	64,6%
E10	0,29	0,07	0,17	56,7%
E11	0,35	0,11	0,11	68,5%
E12	0,35	0,26	0,04	68,5%
E13*	0,50	0,20	0,06	98,8%
E14*	0,33	0,14	0,05	65,0%
E15*	0,41	0,08	0,05	81,4%
E16*	0,43	0,19	0,05	85,0%
Controle	0,23	0,06	0,14	45,0%

*Pontos centrais (PC).

Os parâmetros fermentativos da produção de etanol obtidos após 96 horas de cultivo de *S. stipitis* estão demonstrados na Tabela 7. Nota-se que quanto ao ($Y_{P/S}$), todos os ensaios apresentaram redução nos valores, exceto o ensaio controle, que aumentou para $0,26 \text{ g.g}^{-1}$. O mesmo pode ser observado para a eficiência ($\eta\%$) com uma redução

considerável para todos os ensaios, exceto o ensaio controle, que aumentou de 45 para 50,9%. Os valores para $Y_{X/S}$ (g.g^{-1}) também apresentaram redução, exceto o controle, no qual o valor manteve-se igual. Em relação a Q_P ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}$), apenas os ensaios 12 e PC apresentaram aumento.

Tabela 7 Parâmetros fermentativos da produção de etanol pela levedura *S. stipitis* ATCC 58376 durante o cultivo em meio sintético adicionado de diferentes concentrações de compostos inibidores, após 96 horas

Ensaio	$Y_{P/S}$ (g.g^{-1}) glicose+xilose	$Y_{X/S}$ (g.g^{-1}) glicose+xilose	Q_P ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}$)	Eficiência% (η)
E01	0,00	0,00	0,00	0,0
E02	0,17	0,06	0,08	33,2%
E03	0,00	0,23	0,00	0,0
E04	0,00	0,00	0,00	0,0
E05	0,16	0,11	0,03	31,3%
E06	0,00	0,00	0,00	0,0
E07	0,00	0,00	0,00	0,0
E08	0,00	0,15	0,00	0,0
E09	0,19	0,06	0,09	37,2%
E10	0,16	0,06	0,08	31,3%
E11	0,17	0,08	0,08	33,2%
E12	0,23	0,10	0,07	45,0%
E13*	0,44	0,12	0,10	86,7%
E14*	0,33	0,10	0,09	65,1%
E15*	0,38	0,05	0,08	73,9%
E16*	0,31	0,10	0,08	61,6%
Controle	0,26	0,06	0,12	50,9%

*Pontos centrais (PC).

Esses resultados demonstram que embora a presença de inibidores tenha favorecido o metabolismo de açúcares e a produção de etanol em alguns ensaios, como, por exemplo, o ensaio PC, o efeito nocivo desses compostos se faz evidente após uma exposição prolongada. No caso do ensaio controle, a ausência dos inibidores permitiu que o metabolismo de *S. stipitis* permanecesse inalterado por um tempo mais prolongado, o que explica o aumento no rendimento em etanol entre o período de 72 e 96 horas.

5.2 Avaliação do efeito dos compostos inibidores no crescimento e produção de etanol por *S. stipitis* ATCC 58376 através da análise estatística do planejamento Plackett e Burman 12

As Tabelas 8 e 9 apresentam os efeitos lineares principais dos fatores, os valores do erro-padrão, teste t, p-valor e intervalos de confiança para a resposta crescimento celular após 72 e 96 horas do cultivo de *S. stipitis* ATCC 58376, respectivamente. Observa-se para a variável resposta crescimento celular que apenas o fator ácido acético foi significativo ao

nível de 10% de significância para ambos os tempos (72 e 96 horas). Na Figura 14 (A e B) é possível visualizar melhor os resultados dos efeitos dos fatores após 72 e 96 horas.

Tabela 8 Efeitos principais do planejamento Plackett e Burman 12 para a resposta crescimento celular por *S. stipitis* após 72 horas

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(3)	p-valor	Limite de confiança -90%	Limite de confiança +90%
Média	1,904	0,099	19,316	0,000	1,672	2,136
Furfural	-0,432	0,228	-1,896	0,154	-0,967	0,104
HMF	-0,268	0,228	-1,179	0,323	-0,804	0,267
Ácido acético	-2,445*	0,228	-10,742	0,002	-2,981	-1,909
Vanilina	-0,092	0,228	-0,403	0,714	-0,627	0,444
Ácido siríngico	0,268	0,228	1,179	0,323	-0,267	0,804

Nota: *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,10$).

Tabela 9 Efeitos principais do planejamento Plackett e Burman 12 para a resposta crescimento celular por *S. stipitis* após 96 horas

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(3)	p-valor	Limite de confiança -90%	Limite de confiança +90%
Média	2,367	0,187	12,662	0,001	1,927	2,807
Furfural	-0,848	0,432	-1,965	0,144	-1,864	0,168
HMF	-0,035	0,432	-0,081	0,940	-1,051	0,981
Ácido acético	-2,728*	0,432	-6,320	0,008	-3,744	-1,712
Vanilina	-0,335	0,432	-0,776	0,494	-1,351	0,681
Ácido siríngico	0,305	0,432	0,707	0,531	-0,711	1,321

Nota: *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,10$).

Verifica-se que o efeito do ácido acético apresentou valor negativo, -2,445 e -2,728 para 72 e 96 horas, respectivamente. Esse resultado indica que nas concentrações de ácido acético avaliadas (2,0; 4,0 e 6,0 g.L⁻¹), o grau de inibição do crescimento celular é mais severo que os demais compostos testados, podendo ser reduzido em 2,445 e 2,728 g.L⁻¹ (Figura 15 A e B). Zeferino (2013) verificou que a adição de 1,5 g.L⁻¹ de ácido acético no meio de cultivo de *P. stipitis* NRRL Y-7124 reduziu em 9,3% o seu crescimento em relação ao valor observado no controle (sem ácido acético), que foi de 16,2 g.L⁻¹. À medida que as concentrações desse ácido foram aumentadas para 2,5 e 4,5 g.L⁻¹, a queda no crescimento celular foi de 28 e 57,5%, respectivamente.

Como mencionado anteriormente no presente trabalho, observou-se que a inibição e a redução do crescimento celular ocorreram nos ensaios em que a concentração de ácido acético era 6,0 g.L⁻¹, coincidindo com a inibição do consumo de açúcares nas mesmas condições e a inibição da produção de etanol. As menores concentrações celulares (Figura 10) em 72 e 96 horas foram observadas nos ensaios contendo 6,0 e 4,0 g.L⁻¹ de ácido acético, o que confirma o efeito negativo apresentado pela análise estatística. Bellido et al.

(2011) verificaram a completa inibição do crescimento celular de *P. stipitis* DSM 3651 na presença de $3,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético. Isso demonstra as diferenças no grau de severidade desse ácido de acordo com as concentrações e a linhagem utilizada.

A toxicidade do ácido acético é dependente do pH, pois a forma não dissociada é predominante em meios com pH abaixo do valor da constante de dissociação do ácido ($pK_a = 4,75$), facilitando a difusão deste pela membrana plasmática devido a ser lipossolúvel. Uma vez no interior da célula (pH aproximadamente neutro), o ácido se dissocia, promovendo a acidificação do citoplasma (PEREIRA; MUSSATTO; ROBERTO, 2011). Esse processo interfere no consumo de ATP pela levedura em decorrência de maior demanda pela célula para manutenção do pH interno, desviando parte do ATP que seria utilizado para o crescimento celular e na fermentação (NARENDRANATH et al., 2001).

Em relação aos compostos furfural, HMF e vanilina os resultados mostram que o grau de inibição do crescimento celular nas concentrações avaliadas é menos severo que o do ácido acético, indicando que o crescimento pode ser menor em $0,432$; $0,268$ e $0,092 \text{ g.L}^{-1}$ em 72 horas, respectivamente (Figura 14 A). O ácido siríngico, entretanto, apresentou um efeito positivo, indicando que ele pode aumentar $0,268 \text{ g.L}^{-1}$ no crescimento celular em 72 horas de cultivo.

Em 96 horas de cultivo verifica-se que o crescimento é ainda mais afetado, de acordo com o inibidor, como ocorre com o furfural e a vanilina, promovendo uma redução de $0,848$ e $0,335 \text{ g.L}^{-1}$ no crescimento, respectivamente, enquanto que o HMF diminui $0,035 \text{ g.L}^{-1}$.

A presença de furfural, vanilina e siringaldeído nas concentrações $0,33$ e $0,66 \text{ g.L}^{-1}$, adicionados em mistura no meio de cultivo semissintético, prejudicou o crescimento de *C. guilliermondii* quando comparado ao controle (sem inibidores), observando-se um crescimento lento nas primeiras 20 - 24 horas para concentração de $0,33 \text{ g.L}^{-1}$ da mistura dos inibidores, enquanto que na concentração de $0,66 \text{ g.L}^{-1}$ não houve crescimento celular ao longo do processo (KELLY et al., 2008), diferente do que ocorreu no presente estudo para o furfural, no qual em concentração superior como $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ não afetou significativamente o crescimento da linhagem de *S. stipitis* ATCC 58376.

Os compostos furfural, HMF e vanilina afetaram o crescimento celular da linhagem de levedura *Issatchenkia orientalis* IPE 100 quando adicionados individualmente em meio sintético, de acordo com a concentração, sendo que o furfural e o HMF interferiram negativamente a partir de $5,0 \text{ g.L}^{-1}$, proporcionando um crescimento lento (a partir de 50 horas de fermentação), no caso do furfural, e inibição completa, quando na presença do HMF (KWON et al., 2011). Zhang et al. (2012) observaram completa inibição do crescimento de *C. athensensis* SB18 na presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina.

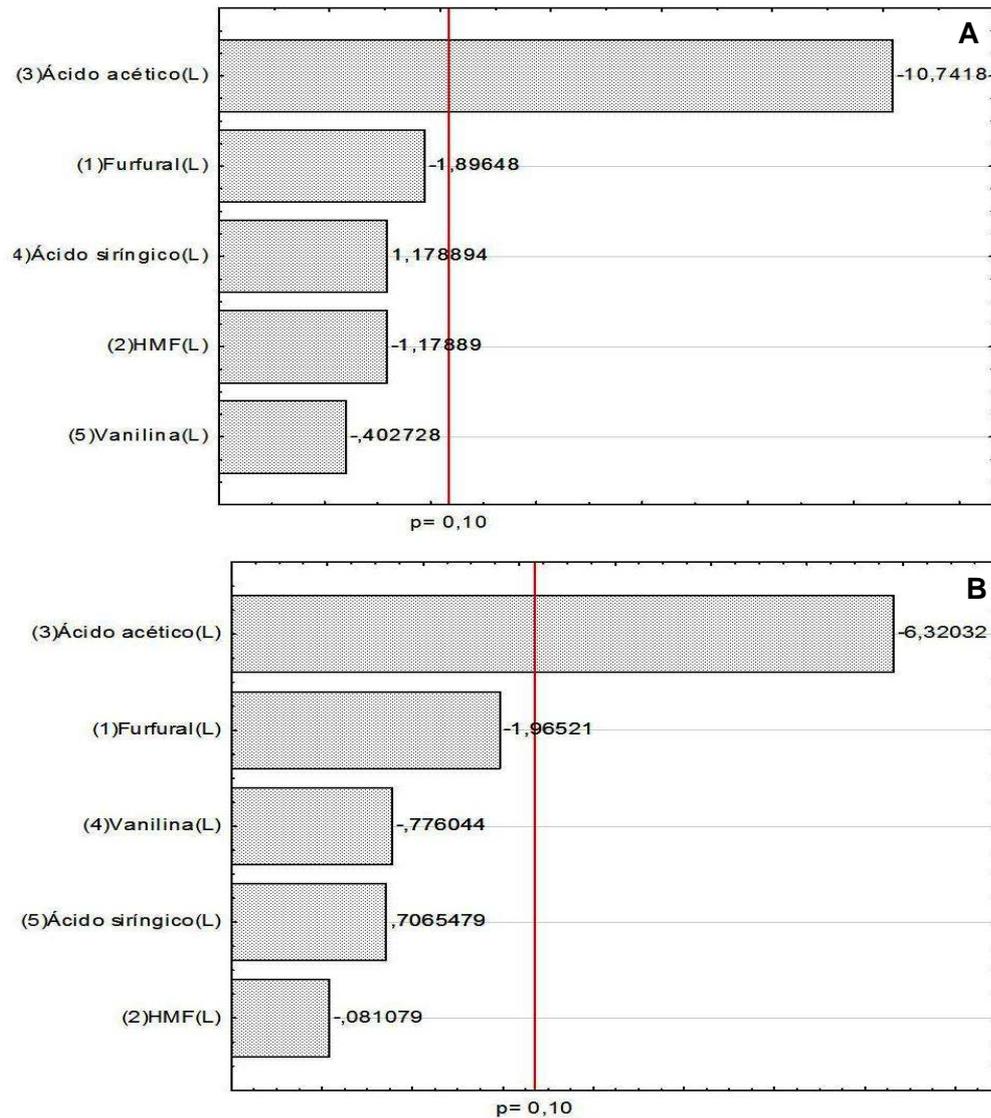


Figura 14 Gráficos de Pareto para a variável crescimento celular após 72 horas (A) e 96 horas (B) do cultivo de *S. stipitis* em meio sintético adicionado de diferentes concentrações de compostos inibidores.

As Tabelas 10 e 11 apresentam os efeitos lineares principais dos fatores, os valores do erro-padrão, teste t, p-valor e intervalos de confiança para a resposta produção de etanol por *S. stipitis* ATCC 58376 após 72 e 96 horas do cultivo. Observa-se que, dentre os fatores avaliados, apenas o furfural não apresentou efeito significativo ao nível de 10% de significância em 72 horas, enquanto que em 96 horas, o ácido acético foi o que mais prejudicou a produção de etanol. Na Figura 15 (A e B) são apresentados os gráficos de Pareto para a variável resposta produção de etanol após 72 e 96 horas de fermentação.

Tabela 10 Efeitos principais do planejamento Plackett e Burman 12 para a resposta produção de etanol por *S. stipitis* após 72 horas

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(3)	p-valor	Limite de confiança -90%	Limite de confiança +90%
Média	4,121	0,091	45,465	0,000	3,908	4,335
Furfural	-0,007	0,209	-0,032	0,977	-0,499	0,486
HMF	-1,500*	0,209	-7,165	0,006	-1,993	-1,007
Ácido acético	-8,510*	0,209	-40,652	0,000	-9,003	-8,017
Vanilina	0,617*	0,209	2,946	0,060	0,124	1,109
Ácido siríngico	1,177*	0,209	5,621	0,011	0,684	1,669

Nota: *Valores estatisticamente significativos ($p < 0,10$).

Tabela 11 Efeitos principais do planejamento Plackett e Burman 12 para a resposta produção de etanol por *S. stipitis* após 96 horas

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(3)	p-valor	Limite de confiança -90%	Limite de confiança +90%
Média	4,863	0,212	22,912	0,000	4,363	5,362
Furfural	-0,935	0,490	-1,908	0,152	-2,088	0,218
HMF	-0,772	0,490	-1,574	0,213	-1,925	0,382
Ácido acético	-7,075*	0,490	-14,436	0,001	-8,228	-5,922
Vanilina	-0,595	0,490	-1,214	0,312	-1,748	0,558
Ácido siríngico	-0,602	0,490	-1,228	0,307	-1,755	0,552

Nota: *Valor estatisticamente significativo ($p < 0,10$).

Em 72 horas do cultivo de *S. stipitis*, observa-se que a produção de etanol foi mais afetada pelos fatores avaliados do que o crescimento celular, visto que os compostos HMF e ácido acético mostram-se mais prejudiciais, pois apresentaram valores negativos -1,500 e -8,510, respectivamente (Figura 15 A). Esses valores representam uma redução em 1,500 e 8,510 g.L⁻¹ na produção de etanol na presença de HMF e ácido acético nas concentrações avaliadas neste trabalho. O furfural, no entanto, apresentou um efeito menor, contribuindo com uma redução de 0,007 g.L⁻¹ na produção de etanol. Com relação aos compostos vanilina e ácido siríngico, observa-se que o efeito foi positivo, revelando que, nas concentrações avaliadas, os dois compostos podem aumentar em 0,617 e 1,177 g.L⁻¹ a produção de etanol até 72 horas.

Alguns estudos mostram que, de acordo com o inibidor e a sua concentração, pode ocorrer o favorecimento de determinados parâmetros de fermentação. A adição de 0,5 e 1,0 g.L⁻¹ de ácido acético em meio semissintético favoreceu a produção e a produtividade de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, com valores máximos de 0,82 g.g⁻¹ e 0,57 g.L.h⁻¹ (FELIPE et al., 1995). Pereira, Mussato e Roberto (2011) observaram que a adição de 0,8 g.L⁻¹ de siringaldeído em meio sintético promoveu um aumento de 0,242 g.g⁻¹ sobre o fator de rendimento em xilitol por *C. guilliermondii* ATCC 201935.

Em 96 horas de cultivo, o ácido acético mostrou-se o fator que mais prejudicou a produção de etanol ($p < 0,10$) apresentando um valor de $-7,075$, o que indica uma redução de $7,075 \text{ g.L}^{-1}$ na produção (Figura 15 B). No mesmo tempo de cultivo, os compostos furfural, HMF, vanilina e ácido siríngico também apresentaram valores negativos, contribuindo para a redução de $0,935$; $0,772$; $0,595$ e $0,602 \text{ g.L}^{-1}$ na produção de etanol nas concentrações avaliadas.

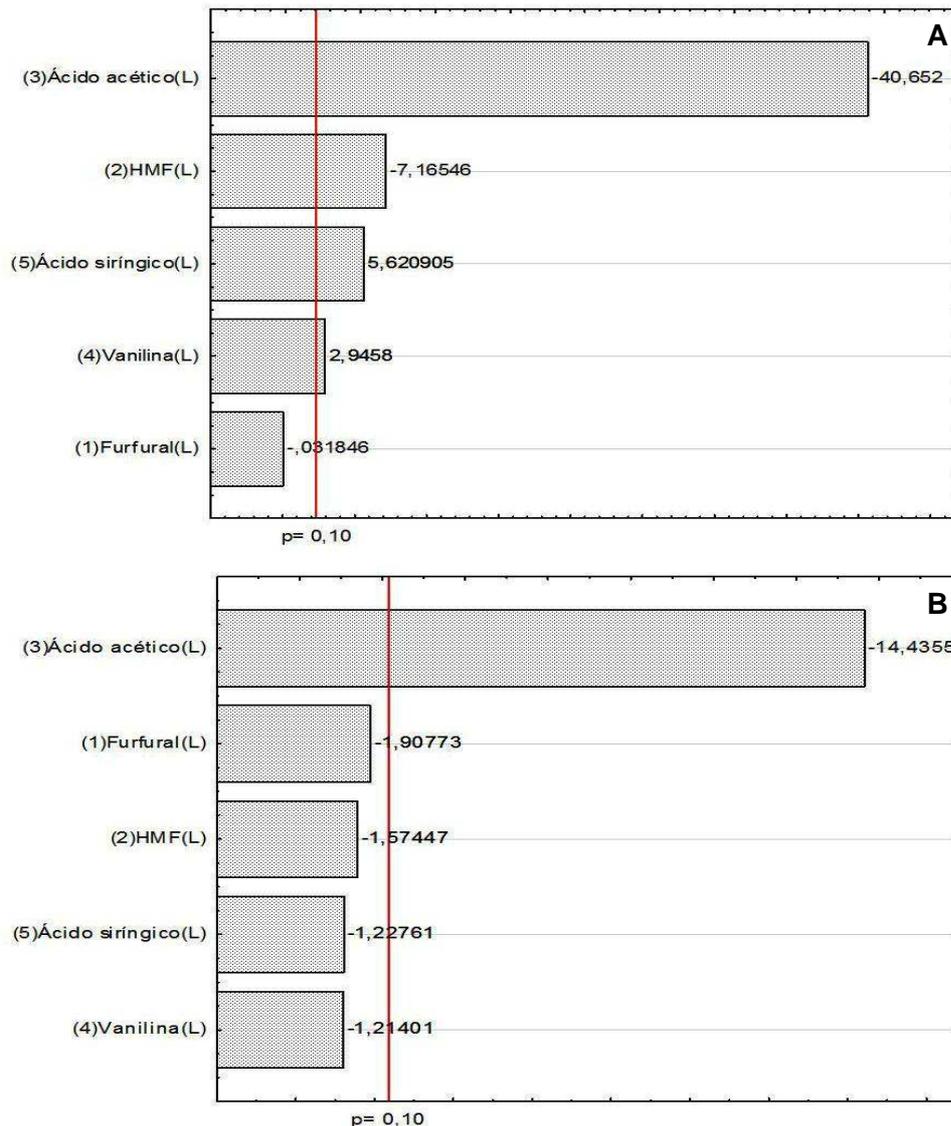


Figura 15 Gráficos de Pareto para a variável produção de etanol após 72 horas (A) e 96 horas (B) do cultivo de *S. stipitis* em meio sintético adicionado de diferentes concentrações de compostos inibidores.

A produção de etanol por *P. stipitis* CBS 6054 foi completamente inibida na presença de $3,1$ e $5,2 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético presente em hidrolisado hemicelulósico de panasco (tipo de gramínea) submetido a diferentes tratamentos (NJOKU et al., 2013), enquanto que, no presente estudo, a completa inibição foi observada nos ensaios contendo

6,0 g.L⁻¹ mesmo na presença de outros inibidores do meio. No entanto, Cho et al. (2010) observaram produção de 8,9 g.L⁻¹ de etanol por *P. stipitis* KCCM 12009 em meio sintético (58 g.L⁻¹ de glicose e 27,8 g.L⁻¹ de xilose), adicionado de 7,1 g.L⁻¹ de ácido acético, que comparado ao controle (24,3 g.L⁻¹ de etanol) verifica-se o quanto esse ácido influenciou negativamente no processo.

Tran e Chambers (1986) verificaram produção de etanol a partir de 50 g.L⁻¹ de xilose por *P. stipitis* CBS 5776 na presença dos compostos ácido acético (11,92 g.L⁻¹), furfural (1,30 g.L⁻¹), vanilina (0,091 g.L⁻¹), e ácido siríngico (0,082 g.L⁻¹), adicionados em meio sintético. Nesse estudo, as concentrações de ácido acético e furfural eram quase duas vezes as concentrações dos maiores níveis (6,0 e 0,75 g.L⁻¹) avaliados no presente trabalho. Os autores verificaram a produção de 5,4 e 20,2 g.L⁻¹ de etanol na presença de ácido acético e furfural, respectivamente. Na presença de vanilina e ácido siríngico, as concentrações de etanol foram de 10,2 e 19,9 g.L⁻¹, enquanto que, no controle, a concentração de etanol foi de 22,3 g.L⁻¹.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram identificar os compostos e as respectivas faixas de concentração inibitórias do metabolismo de *S. stipitis* ATCC 58376. No entanto, o ácido siríngico na faixa de concentração estudada exerce efeito positivo sobre o crescimento celular e a produção de etanol, bem como o ácido acético, até uma concentração de 2,0 g.L⁻¹. Esses resultados contribuem para a escolha de um método de destoxificação adequado para o hidrolisado hemicelulósico, que vise à remoção dos compostos nas faixas de concentração que realmente podem comprometer o processo fermentativo.

7 REFERÊNCIAS

- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K. S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, London. v. 41, p. 2333-2336, 2006.
- AGBOGBO, F. K.; WENGER, K. S. Production of ethanol from corn stover hemicelluloses hydrolyzate using *Pichia stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin. v. 34, p. 723-727, 2007.
- AGBOGBO, F. K.; HAAGENSEN, F. D.; MILAM, D.; WENGER, K. S. Fermentation of Acid-pretreated Corn Stover to Ethanol Without Detoxification Using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York. v. 145, p. 53-58, 2008.
- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, New York. v. 29, p. 675-685, 2011.
- ALVES, E. F.; BOSE, S. K.; FRANCIS, R. C.; COLODETTE, J. L.; IAKOVLEN, M.; VAN HEININGEN, A. Carbohydrate composition of eucalyptus, bagasse and bamboo by a combination of methods. **Carbohydrate Polymers**, New York. v. 82, p. 1097-1101, 2010.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, New York. v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- AQUINO, F. W. B. **Determinação de compostos fenólicos em extratos de *Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith e em aguardentes de cana envelhecidas do Ceará.** 2004. 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- ARSLAN, Y.; EKEN-SARAÇOĞLU, N. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia Stipitis* to ethanol. **Bioresource Technology**, New York. v. 101, p. 8664-8670, 2010.
- ARRUDA, P. V. **Efeito do glicerol na bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 200037.** 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.
- BARAKAT, A.; MONLAU F.; STEYER J.P.; CARRERE, H. Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. **Bioresource Technology**, New York. v. 104, p. 90–99, 2012.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, V. L.; COLODETTE, J. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de Eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI – CG/EM). **Química Nova**, São Paulo. v. 31, n. 8, p. 2035-2041, 2008.
- BELLIDO C.; BOLADO S.; COCA, M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO M. T. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, New York. v.102, p.10868–10874, 2011.

BNDES. Banco Nacional do Desenvolvimento. **BNDES financiará 1ª unidade integrada de etanol de segunda geração do mundo.** Disponível em:

<http://bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_pt/Institucional/Sala_de_Imprensa/Noticias/2013/Todas/20130912_raizen.html>. Acesso em: 25 set. 2013.

BRASIL. Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional 2012 – Ano Base 2011: Resultados Preliminares**, Rio de Janeiro: EPE, 2012, 51 p. Disponível em <https://ben.epe.gov.br/downloads/Resultados_Pre_BEN_2012.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2013.

BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, São Paulo. v. 27, n. 3, p. 399-403, 2004.

CAMARGO, D. **Aproveitamento das frações hemicelulósica e celulósica dos resíduos do processamento do girassol para produção de bioetanol.** 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2012.

CAMARGO, D.; SENE, L. Production of ethanol from the hemicellulosic fraction of sunflower meal biomass. **Biomass Conversion and Biorefinery**. Berlin. DOI 10.1007/s13399-013-0096-0, 2013.

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

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

CUNHA, M. A. A.; CONVERTI, A.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. Yeast immobilization in LentiKats®: a new strategy for xylitol bioproduction from sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Inglaterra. v. 22, n. 1, p. 65-72, 2006.

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

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

CHO, D. H.; SHIN, S-J.; BAE, Y.; PARK, C.; KIM, Y. H. Ethanol production from acid hydrolysates based on the construction and demolition wood waste using *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, New York. v. 102, p. 4439–4443, 2011.

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

DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROCHA, G. J. M.; PRADELLA, J. G. C.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, New York. v. 102, p. 8964-8971, 2011.

EKEN-SARAÇOĞLU, N.; ARSLAN, Y. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht. v. 22, n. 10, p. 855-858, 2000.

EL-ZAWAWY, W. K.; IBRAHIM, M. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SOLIMAN, N. A.; MAHMOUD, M. M. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate Polymers**, New York. v. 84, p. 865-871, 2011.

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

FOYLE, T.; JENNINGS, L.; MULCAHY, P. Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. **Bioresource Technology**, New York. v. 98, p. 3026–3036, 2007.

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

GRAALBIO. **GraalBio anuncia primeira planta de etanol celulósico do Hemisfério Sul**. Disponível em: <[http://graalbio.com/graalbio/wpcontent/uploads/2012/05/Primeira planta de etanol celulósico.pdf](http://graalbio.com/graalbio/wpcontent/uploads/2012/05/Primeira%20planta%20de%20etanol%20celulósico.pdf)>. Acesso em 26 set. 2013.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, Dublin. v. 16, p. 933-943, 1994.

HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H.; BONT, J. A. M. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, New York. v. 12, p. 409-415, 1994.

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

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

JEFFRIES, T. W.; VAN VLEET, J. R. H. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, Amsterdam. v. 9, p. 793–807, 2009.

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

KIIPPER, P. G. **Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus***. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, 2009.

KURIAN, J. K.; MINU, A. K.; BANERJI, A.; KISHORE, V. V. N. Bioconversion of hemicelluloses hydrolysate of sweet sorghum bagasse to ethanol by using *Pichia stipitis* NCIM 3497 and *Debaryomyces hansenii* sp. **BioResources**, New York. v. 5, n. 4, p. 2404-2416, 2010.

KWON, Y. J.; WANG, F.; ZHUANG, G. Q.; LIU, C. Z. Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant *Issatchenkia orientalis*. **Bioresource Technology**, New York. v.102, p. 8099-8104, 2011.

LEE, H-J.; LIM, W-S.; LEE, J-W. Improvement of ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysates by the removal of inhibitors. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Seoul. v. 19, p. 2010-2015, 2013.

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

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, São Leopoldo. v.5, n.1, p. 68-78, 2009.

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**, Golden. v. 27, p. 77-93, 2013.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, New York. v. 96, p. 673-686, 2005.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, London. v. 40, p. 3801-3806, 2005.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin. v. 26, p. 171-177, 2001.

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

NJOKU, S. I.; IVERSEN, J. A.; UELLEND AHL, H.; AHRING, B. K. Production of ethanol from hemicellulose fraction of cocksfoot grass using *Pichia stipitis*. **Sustainable Chemical Processes**. London. v. 1, n. 13, p. 1-7, 2013.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, Dublin. v. 18, p. 312-331, 1996.

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

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

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**. New York, v. 31, p. 547-550, 1989.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, New York. v. 65, p. 191-201, 1998a.

PEREIRA JR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA L. M. M. Biomass of Lignocelulosic Composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**. Rio de Janeiro: Escola de Química - UFRJ, 2008.

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

PIENKOS, P. T.; ZHANG, M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. **Cellulose**, New Orleans. v. 16, p. 743–762, 2009.

PUECH, J. L.; JOURET, C.; GOFFINET, B.; Évolution des composés phénoliques du bois de chêne au cours du vieillissement de l'armagnac. **Science des Aliments**. Cachan, v. 5, n. 3, p. 379-391, 1985.

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

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. N.; REZENDES, T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo. v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SENE, L.; ARRUDA, P. V.; OLIVEIRA, S. M. M.; FELIPE, M. G. A. Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo. v. 42, p. 1141-1146, 2011.

SHEN, F.; SADDLER, J. N.; LIU, R.; LIN, L.; DENG, S.; ZHANG, Y.; YANG, G.; XIAO, H.; LI, Y. Evaluation of steam pretreatment on sweet sorghum bagasse for enzymatic hydrolysis and bioethanol production. **Carbohydrate Polymers**, New York. v. 86, p. 1542-1548, 2011.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, New York. v. 101, p. 4820–4825, 2010.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (Data analysis software system), versão 7.1. Tulsa: Statsoft, 2005.

STOUTENBURG, R. M.; PERROTTA, J. A.; NAKAS, J. P. Overcoming inhibitors in a hemicellulosic hydrolysate: improving fermentability by feedstock detoxification and

adaptation of *Pichia stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin. v. 38, publicação online: maio, 2011.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, New York. v. 83, p. 1–11, 2002.

SUN, J. X.; SUN, F. X.; SUN, R. C.; SUN, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, New York. v. 56, p. 195-204, 2004.

SHUPE, A. M.; LIU, S. Ethanol fermentation from hydrolysed hot-water wood extracts by pentose fermenting yeasts. **Biomass and Bioenergy**, Reino Unido. v. 39, p. 31-38, 2012.

TAVARES, B. **Estudo das condições de cultivo e adaptação do inóculo de *Pichia stipitis* ATCC 58376 para produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol**. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2013.

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

TIAN, X-F; FANG, Z.; GUO, F.. Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Biofuels Bioproducts & Biorefining Biofr.** New York. v. 6, p. 335–350, 2012.

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

UNICA. União da Indústria de cana-de-açúcar. **Associadas da Unica mais próximas de produzir etanol celulósico**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/298109179203115797/associadas-da-unica-mais-proximas-de-produzir-etanol-celulosico/>> Acesso em 25 set. 2013.

WINGREN, A., M.; GALBE, ZACCHI, G., Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood a comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnology Progress**, Flórida. v.19, p. 1109-1117, 2003.

WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York. v. 157, p. 174–209, 2009.

YABLOCHKOVA, E. N.; BOLOTNIKOVA, O. I.; MIKHAILOVA, N. P.; NEMOVA, N. N.; GINAK, A. I. The Activity of Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase in Yeasts. **Microbiology**, Rússia. v. 72, n. 4, p. 466-469, 2003.

YANG, X.; ZHANG, S.; ZUO, Z.; MEN, X.; TIAN, S. Ethanol production from the enzymatic hydrolysis of non-detoxified steam-exploded corn stalk. **Bioresource Technology**, New York. v. 102, p. 7840-7844, 2011.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**. New York. v.56, p. 17-34, 2001.

ZEFERINO, I. A. M. **Identificação de compostos inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal e seus efeitos sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis***. 2013. 207 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

ZHANG, J.; GENG, A.; YAO, C.; LU, Y.; LI, Q. Effects of lignin-derived phenolic compounds on xylitol production and key enzyme activities by a xylose utilizing yeast *Candida athensensis* SB18. **Bioresource Technology**, New York. v. 121, p. 369-378, 2012.

ZHU, J.; YONG, Q.; XU, Y.; YU, S. Detoxification of corn stover prehydrolyzate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776. **Bioresource Technology**, New York. v. 102, p. 1663-1668, 2011.