



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

ÁGATA SILVA CABRAL

**Tratamentos ácidos de hidrólise e avaliação de parâmetros na produção de etanol  
celulósico utilizando resíduos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**

São José do Rio Preto/SP  
2016

ÁGATA SILVA CABRAL

**Tratamentos ácidos de hidrólise e avaliação de parâmetros na produção de etanol celulósico utilizando resíduos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**Orientador:** Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz.

São José do Rio Preto/SP  
2016

Cabral, Ágata Silva.

Tratamentos ácidos de hidrólise e avaliação de parâmetros na produção de etanol celulósico utilizando resíduos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) / Ágata Silva Cabral. -- São José do Rio Preto, 2016  
157 f. : il., tabs.

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biotecnologia. 2. Bioetanol – Indústria. 3. Lignocelulose.  
4. Resíduos industriais. 5. Mandioca. 6. *Saccharomyces cerevisiae*.  
I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 661.722

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

ÁGATA SILVA CABRAL

**Tratamentos ácidos de hidrólise e avaliação de parâmetros na produção de etanol celulósico utilizando resíduos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora:

**Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz**  
UNESP - SÃO JOSÉ DO RIO PRETO  
Orientador

**Prof. Dr. Mauricio Boscolo**  
UNESP - SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

**Prof. Dr. Edson José Fragiorge**  
IFTM - UBERLÂNDIA

São José do Rio Preto/SP  
28 de Novembro, 2016

Às pessoas que lutam diariamente ao meu lado, transmitindo fé, amor, alegria, determinação, paciência e coragem, tornando os meus dias mais felizes e bonitos. Em especial aos meus pais, pelo estímulo, carinho e compreensão.

“Desejo ver um mundo melhor, mais fraternal, em que as pessoas não queiram descobrir os defeitos das outras, mas, sim, que tenham prazer em ajudar o outro.”

*(Oscar Niemeyer)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pela força e coragem não só nesta como em todas as demais conquistas durante a minha caminhada.

Aos meus pais (Jaquelina e Wellington), por me proverem de ensinamentos para a vida, meu irmão (Lucas), que são meus melhores e maiores presentes. Em especial a minha mãe, pelo companheirismo em todos os aspectos da minha vida, pelo apoio fosse aos maus ou bons momentos. Mãe, só você é tão acolhedora, contagiante e querida. Não sei o que faria sem sua presença confortante, você é meu abrigo.

Aos amigos e familiares que, embora saudosos, souberam entender a importância deste momento de trabalho que por tantas vezes justificou a minha ausência.

A todos os professores que me acompanharam durante a jornada da Pós-graduação, que, fosse com exigentes cobranças ou palavras de apoio, me serviram de profunda inspiração. Em especial ao professor e orientador Dr. Crispin, que me acolheu de braços abertos, me conduzindo pelos caminhos da pesquisa com paciência e sabedoria, tornando possível a realização do trabalho. Orgulho-me de ter desenvolvido este estudo sob sua orientação, e, acima de tudo, obrigada por ter sido responsável pelo meu amadurecimento profissional.

Agradeço também aos demais membros da banca examinadora: Dr. Mauricio Boscolo e Dr. Edson José Fragiorge, pela disponibilidade de participação e pelas contribuições pessoais acerca desta Dissertação de Mestrado.

Aos integrantes do Laboratório de Biopolímeros, do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos deste Instituto, agradeço a dedicação e colaboração acerca do projeto, pela disposição e prontidão a me ensinarem a rotina no laboratório, transferindo seus saberes com muito empenho.

A uma amiga especial, Suhelen Tannús, que me forneceu grande apoio e dedicação para que superasse obstáculos e seguisse confiante na vida acadêmica e pela companhia nos estudos, obrigada pela força depositada.

Por fim, deixo minha gratidão à Indústria Moreá Alimentos situada no município de Monte Alegre de Minas/MG, que forneceu a matéria prima para que o projeto fosse executado.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de Mestrado (Processo nº 134205/2014-6) e pelo auxílio financeiro fornecido para a realização do presente estudo. Muito obrigada nunca será suficiente para demonstrar a grandeza do que recebi de vocês!

## RESUMO

Os biocombustíveis têm despertado interesse crescente como alternativa para reduzir o impacto ambiental negativo do uso de combustíveis à base de petróleo, proporcionando ainda maior segurança energética entre os países. Em particular, o etanol celulósico produzido a partir de materiais renováveis lignocelulósicos, entre eles os resíduos agroindustriais, se apresenta como mais competitivo. Neste contexto, o presente trabalho abrange o potencial do uso de resíduos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) obtidos durante o processamento de fécula como matéria-prima para a produção de bioetanol. Foram realizados experimentos de hidrólise nas concentrações de 0,5% até 5% de ácido sulfúrico (v/v). Os resultados demonstraram que H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2% durante 10 minutos de reação a 121°C atingiram a maior liberação de açúcares redutores presentes no resíduo (134,84 g L<sup>-1</sup>). As condições ideais para a fermentação alcoólica utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 foram pH 6,5 e temperatura de 35°C, frascos mantidos sem agitação e concentração de açúcar redutor inicial de 50g L<sup>-1</sup>, resultando em 21,23 g L<sup>-1</sup> de etanol com uma produtividade de 1,86 g L h<sup>-1</sup> e rendimento teórico de 96,5% após 10 horas de fermentação (0,49g/g açúcar fermentescível). Os resultados indicaram que resíduos de mandioca podem servir como um substrato potencial para a produção de etanol, visto que certos parâmetros fermentativos para a otimização do processo foram pesquisados. Assim, este estudo fornece dados práticos sobre as condições mais adequadas para o aproveitamento destes rejeitos industriais visando a geração de energia combustível “limpa”, característica invejável e cada vez mais atrativa num mundo onde cresce a preocupação econômica e ambiental.

**Palavras-chave:** Biocombustível; material lignocelulósico; resíduos de mandioca; hidrólise ácida; *Saccharomyces cerevisiae*.



## ABSTRACT

Biofuels has increased interest as alternative to reduce the negative environmental impact of petroleum-based fuels use, providing greater energy security among countries. In particular, cellulosic ethanol produced from renewable lignocellulosic materials including agroindustrial wastes presents as most competitive. In this context, this work has focused on the potential use of cassava waste (*Manihot esculenta* Crantz) obtained from starch processing as raw material for bioethanol production. Hydrolysis experiments were conducted in concentrations from 0.5% to 5% sulfuric acid (v/v). The results showed that 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 10 minutes at 121°C reaction reached the highest release of reducing sugars present in the residue (134.84 g L<sup>-1</sup>). The optimal conditions for the alcohol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 strain has pH 6.5, temperature of 35°C, flasks without stirring and initial reducing sugar concentration of 50g L<sup>-1</sup>, resulting in 21.23 g L<sup>-1</sup> ethanol with a productivity of 1.86 g L h<sup>-1</sup> and theoretical yield of 96.5% after 10 hours fermentation (0.49 g/g fermentable sugar). These results indicated that cassava residues may serve as potential substrate for ethanol production, since certain fermentation parameters for process optimization were investigated. This study provides practical information on the most suitable conditions for use of these industrial wastes aiming to generate “clean” energy, an enviable and increasingly attractive feature in a world where economic and environmental concerns are growing.

**Keywords:** Biofuel; lignocellulosic material; cassava waste; acid hydrolysis; *Saccharomyces cerevisiae*.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Produção mundial de biocombustíveis no ano de 2014. ....  | 20 |
| <b>Figura 2</b> - Evolução do consumo de etanol no Brasil e EUA.....  | 23 |
| <b>Figura 3</b> - Processo de produção do etanol de segunda geração. ....   | 28 |
| <b>Figura 4</b> - Estrutura celular de levedura.....  | 31 |
| <b>Figura 5</b> - Via glicolítica da levedura <i>S. cerevisiae</i> .....  | 33 |
| <b>Figura 6</b> - Visão geral das vias do metabolismo da glicose e xilose em leveduras.....   | 40 |
| <b>Figura 7</b> - Descrição geral das vias bioquímicas que conduzem à formação de glicerol, piruvato e etanol.....  | 44 |
| <b>Figura 8</b> - Mecanismo de floculação <i>lectin-like</i> em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....  | 47 |
| <b>Figura 9</b> - Representação esquemática da multiplicidade de fatores que afetam a floculação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                       | 48 |
| <b>Figura 10</b> - Visão geral do efeito do processo de fermentação na tolerância ao etanol e da remodelação da membrana celular de <i>S. cerevisiae</i> . .... | 52 |
| <b>Figura 11</b> - Principais biomassas renováveis baseadas em carboidratos.....  | 54 |
| <b>Figura 12</b> - Rendimento teórico da produção de etanol a partir da lignocelulose de cana-de-açúcar. .  | 56 |
| <b>Figura 13</b> - Representação esquemática da molécula de celulose.....   | 57 |
| <b>Figura 14</b> - Representação das ligações de hidrogênio supramolecular da celulose.....   | 57 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 15</b> - Representação esquemática da hemicelulose. ....   | 58 |
| <b>Figura 16</b> - Representação esquemática da lignina. ....  | 59 |
| <b>Figura 17</b> - Ilustração esquemática mostrando os principais componentes da lignocelulose. ....   | 60 |
| <b>Figura 18</b> - Rendimento teórico aproximado da produção de etanol celulósico a partir de resíduos de mandioca por hectare cultivado.....  | 67 |
| <b>Figura 19</b> - Diagrama esquemático de processos industriais à base de mandioca e a bioconversão de resíduos de mandioca em produtos de valor acrescentado (biorrefinaria). .... | 68 |
| <b>Figura 20</b> - Processo de liberação do cianeto por enzimas autóctones. ....   | 69 |
| <b>Figura 21</b> - Reações que ocorrem durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos.....  | 75 |
| <b>Figura 22</b> - Degradação de monossacarídeos em álcali .....   | 81 |
| <b>Figura 23</b> - Açúcares redutores (AR) liberados utilizando diferentes concentrações de ácido sulfúrico e tempos de aquecimento aplicados aos resíduos de mandioca. ....         | 91 |
| <b>Figura 24</b> - Açúcares Totais (AT) liberados durante a hidrólise ácida de resíduos de mandioca em diferentes concentrações de ácido sulfúrico e tempos de aquecimento. ....     | 93 |
| <b>Figura 25</b> - Compostos fenólicos liberados utilizando diferentes tempos de aquecimento e concentrações de ácido sulfúrico.....   | 96 |
| <b>Figura 26</b> - Açúcares redutores totais e glicose liberados durante a hidrólise ácida dos resíduos de mandioca sem aquecimento. ....  | 97 |
| <b>Figura 27</b> - Hidrolisados de resíduos de mandioca após a etapa de detoxificação por carvão ativado para remoção de compostos fenólicos.....                                    | 98 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 28</b> - Variação do pH nos hidrolisados brutos utilizados como substratos nos meios de cultura para fermentação prévia de 24 horas pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....   | 99  |
| <b>Figura 29</b> - Produção de bioetanol pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 em Meio Sintético-MS, Hidrolisado Bruto-HB e Hidrolisado Detoxificado-HD, nos tempos de 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas incubados a 30°C. ....  | 101 |
| <b>Figura 30</b> - Esquema mostrando o passo-a-passo simplificado dos 72 processos fermentativos (36 fermentações para HB; 36 fermentações para MS) realizados com a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 utilizando uma combinação de variáveis (concentração de substrato, agitação e temperatura).....        | 103 |
| <b>Figura 31</b> - Variação de pH durante as fermentações realizadas com meios de cultivo contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) com concentração inicial de açúcares redutores de 25g L <sup>-1</sup> . ....  | 104 |
| <b>Figura 32</b> - Variação de pH durante as fermentações realizadas com meios de cultivo contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) com concentração inicial de açúcares redutores de 50g L <sup>-1</sup> . ....  | 105 |
| <b>Figura 33</b> - Variação de pH durante as fermentações realizadas com meios de cultivo contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) com concentração inicial de açúcares redutores de 75g L <sup>-1</sup> . ....  | 106 |
| <b>Figura 34</b> - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 25g L <sup>-1</sup> e frascos mantidos sem agitação (0 rpm)..       | 107 |
| <b>Figura 35</b> - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 25g L <sup>-1</sup> e frascos mantidos sob agitação (75 rpm). ....  | 110 |
| <b>Figura 36</b> - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 25g L <sup>-1</sup> e frascos mantidos sob agitação (150 rpm). .... | 112 |

**Figura 37** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 50g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sem agitação (0 rpm)..  
..... 115

**Figura 38** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 50g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sob agitação (75 rpm).  
..... 117

**Figura 39** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 50g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sob agitação (150 rpm).  
..... 118

**Figura 40** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 75g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sem agitação (0 rpm).  
.....120

**Figura 41** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 75g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sob agitação (75 rpm)..... 121

**Figura 42** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 75g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sob agitação (150 rpm).  
..... 123

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Estados Unidos são os maiores produtores mundiais <i>low-cost</i> de etanol.<br>.....  | 21  |
| <b>Tabela 2.</b> Perspectivas da Produção de Etanol. ....   | 25  |
| <b>Tabela 3.</b> Capacidade produtiva de etanol celulósico no país. ....  | 29  |
| <b>Tabela 4.</b> Exemplos ilustrando a extensão da gama de substratos em <i>S. cerevisiae</i> . ....  | 42  |
| <b>Tabela 5.</b> Produção mundial de mandioca de acordo com o continente e países selecionados como principais produtores (milhões de toneladas). ....  | 62  |
| <b>Tabela 6.</b> Principais produtores de mandioca no país entre a safra de 2014/2015. ....   | 63  |
| <b>Tabela 7.</b> Características físico-químicas de resíduos de mandioca de mesa. ....  | 66  |
| <b>Tabela 8.</b> Teor de HCN de mandioca e alguns produtos utilizados na alimentação animal. ....   | 70  |
| <b>Tabela 9.</b> Técnicas utilizadas na detoxificação de hidrolisados lignocelulósicos e suspensões.<br>.....   | 81  |
| <b>Tabela 10.</b> Variáveis utilizadas nas fermentações para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....   | 86  |
| <b>Tabela 11.</b> Compostos fenólicos dos hidrolisados, antes e após o processo de detoxificação. ....  | 98  |
| <b>Tabela 12.</b> Resumo da produção de etanol e biomassa por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 utilizando resíduos de mandioca hidrolisados com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 2% (v/v) em condições favoráveis de fermentação. ....    | 125 |
| <b>Tabela 13.</b> Resumo da produção de etanol e biomassa por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 utilizando resíduos de mandioca hidrolisados com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 2% (v/v) em condições desfavoráveis de fermentação. .... | 125 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....   | 17 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....  | 19 |
| 2.1 Geral .....  | 19 |
| 2.2 Específicos .....  | 19 |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | 20 |
| 3.1 Consumo de biocombustíveis renováveis e sustentáveis no mundo .....                                      | 20 |
| 3.2 Etanol como importante biocombustível.....   | 22 |
| 3.3 Propriedades e aplicações do etanol.....   | 26 |
| 3.4 Etanol celulósico: Produção e Perspectivas .....   | 27 |
| 3.5 Microrganismos produtores de etanol .....  | 30 |
| 3.5.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Características da levedura .....                                    | 30 |
| 3.5.2 Fatores que afetam o metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na produção de etanol.             | 32 |
| 3.5.3 Estirpe como alvo de modificações genéticas.....   | 35 |
| 3.5.3.1 Utilização de amido.....   | 36 |
| 3.5.3.2 Utilização de xilose .....   | 37 |
| 3.5.4 Produção de etanol, melhoria no desempenho do processo e eliminação de subprodutos da fermentação..... | 43 |
| 3.5.5 Floculação em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....  | 45 |
| 3.5.6 Mecanismos de tolerância ao etanol .....   | 51 |
| 3.6 Matérias-primas para a produção de biocombustíveis .....   | 53 |
| 3.6.1 Materiais lignocelulósicos.....  | 55 |
| 3.6.2 Mandioca e seus resíduos.....  | 61 |
| 3.6.2.1 Glicosídeos cianogênicos presentes em <i>Manihot</i> sp. ....  | 68 |
| 3.7 Hidrólise do material lignocelulósico.....   | 71 |
| 3.8 Compostos inibidores em hidrolisados lignocelulósicos.....   | 74 |
| 3.8.1 Ácidos carboxílicos.....   | 75 |
| 3.8.2 Furfural e Hidroximetilfurfural .....  | 77 |
| 3.8.3 Compostos fenólicos .....  | 78 |
| 3.8.4 Outros compostos inibitórios à microbiota fermentativa .....   | 79 |
| 3.9 Detoxificação dos hidrolisados .....   | 80 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 83  |
| 4.1 Resíduos de Mandioca .....   | 83  |
| 4.2 Hidrólise dos resíduos de mandioca.....  | 83  |
| 4.2.1 Padronização .....   | 83  |
| 4.2.2 Detoxificação .....  | 84  |
| 4.3 Microrganismo e Meios de Cultura.....  | 84  |
| 4.3.1 Levedura .....   | 84  |
| 4.3.2 Meio para armazenamento, enriquecimento e pré-fermentação .....  | 84  |
| 4.3.3 Meio para fermentação e preparo do pré-inóculo .....   | 85  |
| 4.4 Fermentação .....  | 85  |
| 4.4.1 Padronização do Inóculo.....   | 86  |
| 4.4.2 Meio Sintético.....  | 86  |
| 4.4.3 Meio com Hidrolisado Detoxificado.....   | 87  |
| 4.4.4 Meio com Hidrolisado sem Detoxificar (Hidrolisado Bruto) .....   | 87  |
| 4.5 Métodos Analíticos .....   | 87  |
| 4.5.1 Determinação de Açúcares Totais (AT).....  | 87  |
| 4.5.2 Determinação de Açúcares Redutores (AR) .....  | 87  |
| 4.5.3 Determinação de Glicose .....  | 87  |
| 4.5.4 Determinação de Compostos Fenólicos.....   | 88  |
| 4.5.5 Determinação de etanol.....  | 88  |
| 4.5.6 Produtividade .....  | 89  |
| 4.6 Análise Estatística .....  | 89  |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 90  |
| 5.1 Padronização da hidrólise ácida dos resíduos de mandioca.....  | 90  |
| 5.2 Detoxificação do hidrolisado .....   | 97  |
| 5.3 Fermentação Prévia.....  | 99  |
| 5.3.1 Variação de pH .....   | 99  |
| 5.3.2 Produção de Bioetanol .....  | 100 |
| 5.4 Fermentações Sucessivas .....  | 102 |
| 5.4.1 pH.....  | 103 |
| 5.4.2 Crescimento celular, produção de etanol e consumo de açúcares redutores pela levedura<br><i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... | 106 |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....   | 130 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 131 |
| <b>APÊNDICES</b> .....   | 154 |



## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O acelerado crescimento da população mundial está muitas vezes associado ao maior consumo energético. Portanto, a dependência mundial por energia tornou inevitável à busca por combustíveis de origem renovável, principalmente devido a preocupações acerca de questões de natureza política entre países, uso extensivo de combustíveis fósseis, decréscimo gradual das reservas petrolíferas, mudanças climáticas e poluição ambiental (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). Isso torna as pesquisas por fontes de energia renováveis que possam reduzir ou mesmo sanar tais problemas uma questão de atenção generalizada (STOCKER, 2008).

Os combustíveis, como por exemplo, o etanol obtido por processos de biotransformação estão competindo por mercado com os de origem fóssil (gasolina, gás natural, etc.). Grande parte do álcool combustível no Brasil provém da fermentação da cana-de-açúcar, contudo, outras matérias primas disponíveis podem ser utilizadas para este fim, inclusive os rejeitos agroindustriais, não apenas os de base celulósica, mas também aqueles que apresentam grande quantidade de amido. A utilização destes na geração de etanol pode, além de evitar a competição com alimentos, estabilizar o preço do biocombustível frente à gasolina e diminuir os possíveis impactos ambientais que esta última possa vir a provocar.

Anualmente, grande quantidade de resíduos lignocelulósicos é gerada a partir de atividades agroindustriais. Estes materiais muitas vezes não são utilizados e geralmente eliminados no meio ambiente sem qualquer tipo de tratamento, conduzindo a problemas de poluição ambiental (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003). Um exemplo são os resíduos de mandioca, que possuem além da base lignocelulósica grande quantidade de amido residual resultante do descasque da raiz tuberosa (OLIVEIRA; VAUGHAN; RYKIEL JR., 2005; STOCKER, 2008). Por sua composição, este tubérculo apresenta grande importância como matéria-prima agroindustrial, além do que, os resíduos gerados podem ser utilizados para se produzir etanol (CEREDA; VILPOUX, 2003).

Resíduos de mandioca são gerados durante o processamento da matéria-prima (em média 0,47 t/t de mandioca processada) e são constituídos por 25% de celulose, 7% de hemicelulose, 5% de proteína bruta, 60% de amido residual proveniente da polpa, 20% de fibras e 3% de lignina (MOSHI et al., 2015). Indústrias do processamento de mandioca enfrentam problemas devido à exposição dos resíduos ao ar livre sem um descarte apropriado

e pelo tempo excessivo que levam para se decompor, além de servirem como atrativo de moscas e outros insetos indesejáveis. Estes rejeitos poderiam ser direcionados para uma melhor utilização, por exemplo, na produção de biocombustíveis. Tais vantagens estão relacionadas a fatores econômicos e ambientais, quando comparadas aos processos tradicionais que utilizam matérias-primas concomitantemente destinadas à alimentação (milho, cana-de-açúcar). Por fim, a inclusão de altas concentrações de resíduos de mandioca em alimentos para animais monogástricos ou como parte da formulação de dietas é limitada devido a sua natureza fibrosa, composta de uma quantidade elevada de polissacáridos estruturais, resultando em baixa digestibilidade. Além disso, a utilização da casca também é restrita devido aos níveis de toxicidade extremamente elevados do cianeto de hidrogênio e do baixo teor em proteínas (ADEREMI; NWORGU, 2007). Em vista do exposto, fica claro que a bioconversão destes resíduos em fontes de energia renováveis promove um melhor aproveitamento dos mesmos, além de reduzir a utilização de combustível fóssil, contribuir na minimização de alterações climáticas e, conseqüentemente, promover a inovação em biorrefinarias de pequena e grande escala em que as comunidades locais possam adicionar valor aos subprodutos gerados na industrialização da mandioca.

Portanto, o objetivo deste trabalho consistiu na busca de um processo de hidrólise ácida visando a liberação de açúcares provenientes de resíduos de mandioca descartados para posterior produção de etanol a nível laboratorial. Além do mais, contribuir no desenvolvimento de uma tecnologia integrada e diversificada na produção de combustíveis, produtos químicos, energia e outros materiais de interesse do mercado industrial, visando à mínima geração de resíduos e emissões de gases nocivos a partir de fontes de energias renováveis e que englobem o conceito de biorrefinaria como aplicado aos derivados do petróleo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

✓ Investigar o melhor processo de hidrólise ácida para a produção de etanol, em escala laboratorial, dos açúcares provenientes dos resíduos de mandioca.

### **2.2 Específicos**

✓ Utilizar os resíduos de mandioca para obtenção de açúcares fermentescíveis por via ácida.

✓ Determinar o melhor tempo de contato e concentração de ácido sulfúrico aplicado aos resíduos em cada teste de hidrólise.

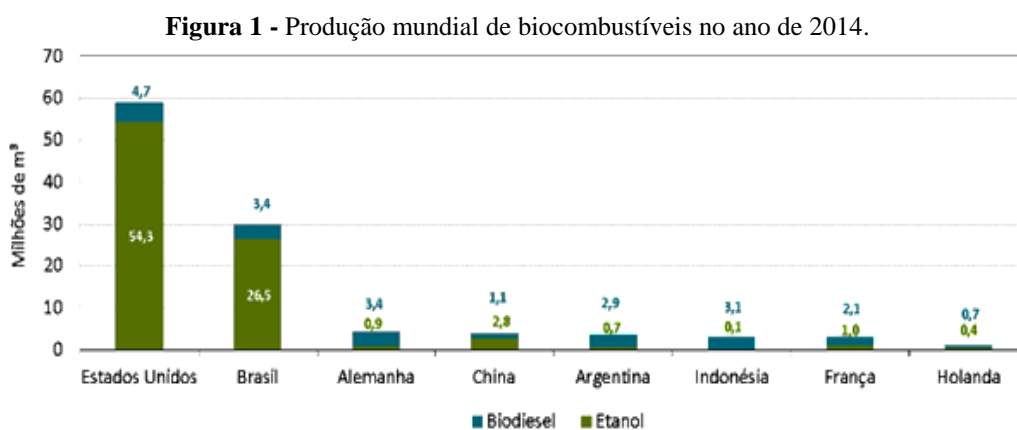
✓ Determinar os melhores parâmetros fermentativos (pH, tempo, concentração de açúcares redutores, agitação e temperatura) para a obtenção do melhor rendimento em etanol.

✓ Estimar os níveis de etanol celulósico gerados a partir dos ensaios fermentativos com os respectivos hidrolisados das cascas e demais resíduos sólidos de mandioca.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Consumo de biocombustíveis renováveis e sustentáveis no mundo

A produção mundial de etanol combustível atualmente gira em torno de 80 bilhões de litros por ano, e a maior parte deste total (cerca de 95%) é produzida pela fermentação de determinados açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (RFA, 2016). O setor sucroalcooleiro movimenta cerca de 2% do PIB brasileiro, assegurando empregos diretos e indiretos, permitindo ao Brasil implantar em larga escala um programa de combustível alternativo ao petróleo, com muitas vantagens ambientais, econômicas e sociais (MAPA, 2016). Em 2014, os Estados Unidos foram considerados o maior produtor mundial de biocombustíveis, com 59,0 milhões de m<sup>3</sup> (54,3 milhões de m<sup>3</sup> de etanol e 4,7 milhões de m<sup>3</sup> de biodiesel). A produção mundial de biocombustíveis chegou a 123,7 milhões de m<sup>3</sup> (94,0 milhões de m<sup>3</sup> de etanol e 29,7 milhões de m<sup>3</sup> de biodiesel). Neste cenário, o Brasil seguiu em segundo lugar no ranking de produção, gerando em torno de 26,5 milhões de m<sup>3</sup> de etanol e 3,4 milhões de m<sup>3</sup> de biodiesel, conforme pode ser observado nos dados da Figura 1 (ANP, 2016).



Fonte: ANP (2016).

Apesar dos EUA serem os maiores produtores mundiais de etanol, neste país o combustível é produzido a partir do amido de milho, principalmente, resultando na obtenção de 1,3 equivalentes de energia para cada equivalente de energia gasto no processo. Por outro lado, a produção de etanol a partir dos açúcares da cana-de-açúcar no Brasil resulta em 9,2 equivalentes de energia para cada equivalente gasto no processo, sendo esta forma de produção mais sustentável que a descrita anteriormente (TILMAN et al., 2011). Desta

maneira, pode-se afirmar que o etanol é um dos produtos biotecnológicos mais importantes no cenário brasileiro e até mesmo mundial, quando se leva em conta os quesitos valor, quantidade e sustentabilidade. No entanto, para que o etanol produzido no país continue a ser competitivo é fundamental que se continue a investir no aprimoramento dos processos de produção (MACEDO, 2007).

Apesar da riqueza energética oferecida pela cana-de-açúcar frente ao milho, este último foi submetido à processos de melhoramento via engenharia genética, inclusive melhorias de design, novas tecnologias de processos, automação e upgrades, entre outros avanços que acabaram gerando maior eficiência na produção do etanol proveniente dos EUA. Por sua vez, essas melhorias reduziram gastos nas instalações e também os impactos ambientais associados à fabricação do mesmo. Em outras palavras, produtores americanos estão a produzir mais com menos, enquanto também estão recebendo mais por cada tonelada de milho processado, ao mesmo tempo em que o volume de fertilizantes, energia e terra necessários para produzir um alqueire de milho continua a cair vertiginosamente (RFA, 2016). No ano de 2015, o mercado de exportação serviu como fonte crucial na demanda de etanol nos EUA, com cerca de 850 milhões de litros destinados para mais de 50 países. Uma série de novos parceiros comerciais entrou na briga, incluindo a rápida emergência da China como topo de destino para a exportação do álcool (pois a principal preocupação do governo chinês é justamente a poluição), o que gerou uma tendência crescente de importação por parte dos asiáticos do etanol proveniente dos EUA. Volumes robustos de exportação demonstraram que indústrias estrangeiras estão valorizando cada vez mais o etanol por sua propriedade única de octanagem, assim como as refinarias dos EUA aperfeiçoam continuamente suas operações, tornando o etanol mundialmente como o mais barato e competitivo, conforme a Tabela 1 (RFA, 2016).

**Tabela 1.** Estados Unidos são os maiores produtores mundiais *low-cost* de etanol.

|      | Etanol-Brasil          | Etanol-EUA | Diferença |
|------|------------------------|------------|-----------|
|      | Dólar americano/galão* |            |           |
| 2010 | \$2.82                 | \$1.83     | \$(0.99)  |
| 2011 | \$3.37                 | \$2.56     | \$(0.81)  |
| 2012 | \$2.40                 | \$2.24     | \$(0.16)  |
| 2013 | \$2.34                 | \$2.23     | \$(0.11)  |
| 2014 | \$2.28                 | \$2.04     | \$(0.24)  |
| 2015 | \$1.81                 | \$1.52     | \$(0.29)  |

\*equivalente a 3,78 litros/etanol.

Fonte: Adaptado de RFA (2016).

A escassez das reservas de petróleo consideradas dentre as principais fontes energéticas mundiais, juntamente com as preocupações com a preservação do meio ambiente, são os principais motivos que levaram os governos a buscarem estratégias para obter uma produção relevante e um maior consumo de combustíveis que sejam renováveis e sustentáveis. A queima dos combustíveis fósseis já representa 82% das emissões dos gases que causam efeito estufa (MACEDO, 2007). O etanol até o momento atual é produzido majoritariamente por meio de matérias-primas sacarinas ou amiláceas, como por exemplo, a cana-de-açúcar e milho. Existe hoje um grande esforço mundial para a redução da emissão de gases que causam o efeito estufa, e esse fato tem levado a uma busca contínua de ações que viabilizem novas fontes alternativas energéticas, sendo que a utilização do etanol faz parte deste esforço e o Brasil já utiliza o produto em grande escala (TILMAN et al., 2011). Embora no país o uso de cana-de-açúcar para produção de álcool seja muito bem sucedido, outras matérias-primas devem ser consideradas futuramente, seja para possibilitar a produção em regiões sem vocação agrícola para aquela cultura, seja para inclusão de pequenos produtores usando materiais amiláceos como mandioca e batata-doce, ou com a utilização de materiais lignocelulósicos (MACHADO; ABREU, 2006).

### **3.2 Etanol como importante biocombustível**

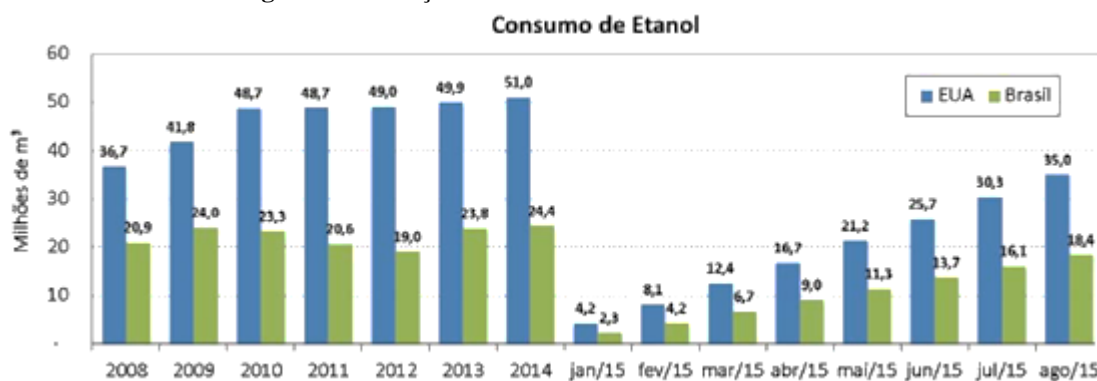
O uso do etanol tem suscitado grande interesse devido à alta dos preços e principalmente aos problemas ambientais relacionados aos combustíveis fósseis. Trata-se de um produto renovável com características combustíveis, que contribui na redução do efeito estufa, que nada mais é do que o resultado da retenção, na atmosfera, do calor refletido pela superfície terrestre, onde o dióxido de carbono liberado na queima de combustíveis fósseis desempenha papel central como poluente. Em grandes proporções, este fenômeno pode se tornar extremamente prejudicial aos seres vivos expostos a altas temperaturas, o que poderia ser incompatível às condições fisiológicas de espécies de vida existentes no planeta. Portanto, o uso do etanol pode, além disso, diminuir substancialmente a poluição do ar, minimizando os seus impactos tanto na saúde pública quanto ambiental. Da última década até o presente, este vem sendo o principal biocombustível empregado mundialmente, correspondendo por 10% da energia mundial. No entanto, estimativas indicam que a utilização mundial do etanol será em torno de 27% até 2050 (IEA, 2016). Diversos são os países com interesse em iniciativas que envolvam o uso do álcool combustível, entre os quais se destacam: Austrália, Guatemala,

União Europeia, Índia, Japão, Nova Zelândia, Nicarágua e Tailândia. Os importadores tradicionais são os Estados Unidos, a União Europeia, Japão e Coreia (SANTOS et al., 2012).

Um acordo firmado pela PEA (*Policy Energy Act*), seguida pela EISA (*Energy Independence and Security Act*), almeja que em 2022 sejam obtidos por volta de 36 bilhões de galões de bioetanol por ano (LIMAYEM; RICKE, 2012), inclusive a União Europeia almeja o uso de 10% de biocombustíveis de segunda geração no setor de transporte em 2020. Neste contexto, estudos de modelagem apontam que uma planta piloto seja capaz de gerar 40.000 t etanol/ano a partir de 240.000 t biomassa/ano (PORZIO et al., 2012).

O Brasil e os Estados Unidos produzem o etanol a partir de cana-de-açúcar e milho, respectivamente, sendo os maiores produtores mundiais e juntos respondem por 89% da produção global (Figura 2). De acordo com o Ministério de Minas e Energia (2016), a produção de etanol foi de 10,9 e 12,82 bilhões de galões nos anos de 2009 e 2010, representando 55% da produção mundial. Adicionalmente, a Figura 2 compara a demanda de etanol nos EUA e no Brasil, indicando que em 2014, os países consumiram cerca de 51 e 24,4 milhões de m<sup>3</sup> deste álcool, respectivamente.

**Figura 2** - Evolução do consumo de etanol no Brasil e EUA.



Fonte: MME (2016).

A substituição da gasolina pelo etanol no Brasil começou em 1975, quando o governo lançou o Programa do Alcool (Proálcool), uma iniciativa governamental para minimizar os constantes aumentos no preço bem como a dependência das importações de petróleo na época, e tinha como objetivos garantir o suprimento de etanol e apoiar o desenvolvimento tecnológico da indústria sucroalcooleira (ANP, 2016). Tais metas visavam ainda reduzir as disparidades regionais de renda, pois se previa também a produção de etanol de mandioca o que, de certo modo, democratizaria o programa, visto que a raiz é produzida majoritariamente por pequenos produtores. O uso desse tubérculo viabilizaria a construção de destilarias

menores capazes de propiciar autossuficiência energética no meio rural (MACHADO; ABREU, 2006). Em meados de 1983 a 1988, mais de 90% dos automóveis vendidos no mercado interno eram movidos a etanol. Ao passar do tempo houve um declínio nos preços do petróleo (final da década de 80), aumento no preço e liberação da exportação do açúcar, onde a produção do etanol já não era economicamente tão viável levando à redução da produção do mesmo. Porém, apesar das flutuações, o etanol manteve-se como importante componente na matriz energética brasileira, uma vez que passou a ser misturado à gasolina (KOHLHEPP, 2010). Na tentativa de acompanhar o mercado ocorreram movimentos de adaptação da indústria automotiva, que passou a manufaturar em larga escala os carros bicompostíveis (*flex*), garantindo o escoamento da produção de etanol e ampliando a liberdade de escolha dos consumidores na hora de abastecer (ANP, 2016).

No auge do Proálcool iniciou-se à produção de etanol proveniente da mandioca, considerada fonte de alimentação da população carente do interior do país. Dos carboidratos da mandioca (amido) pode ser extraído o etanol através da fermentação e destilação dos substratos de glicose. Mesmo que a mandioca seja considerada mais robusta que a cana-de-açúcar e as safras estão disponíveis ao longo do ano todo, a produtividade de etanol desse vegetal sempre foi bem mais reduzida que a do etanol produzido da cana-de-açúcar. Assim, surgiu somente uma empresa modelo produzindo etanol à base de mandioca (KOHLHEPP, 2010). Outras seis usinas de álcool de mandioca chegaram a ser construídas no Brasil na década de 80, com financiamentos públicos e incentivos fiscais. Porém, foram instaladas em regiões não tradicionais, ou em fim de ciclo no polo mandioqueiro, o que fez com que o empreendimento se tornasse inviável e a ideia fosse abandonada (ANP, 2016).

Desde o ano de 2006, o Brasil é autossuficiente no abastecimento de petróleo, o que significa que a nova euforia para a ampliação da produção de biocombustíveis é atribuída à discussão internacional sobre mudanças climáticas e às tentativas de aumento da utilização de energias renováveis com conseqüente diminuição de emissão de CO<sub>2</sub>, visando naturalmente à enorme subida do preço da energia fóssil. O Brasil apresenta condições naturais extremamente favoráveis para a produção de biocombustíveis, potencial certamente útil para firmar seu lugar no mercado internacional (KOHLHEPP, 2010). Notadamente, a Coreia do Sul tem se destacado como um importante polo importador de etanol brasileiro nos últimos anos, mantendo-se entre os três maiores importadores desde 2010. No entanto, tal país não apresenta uma política mandatória de mistura carburante e praticamente todo o etanol importado é insumo para a alcoolquímica (EPE, 2016).



Os automóveis que circulam no país hoje são abastecidos, além dos demais combustíveis convencionais, com dois tipos de etanol: o hidratado, consumido em motores desenvolvidos para este fim, ou o anidro, misturado à gasolina, sem prejuízo aos motores, em proporções variáveis. Por sofrer um menor número de operações produtivas, o álcool hidratado é, em média, 4,5% mais barato do que o álcool anidro, sendo que o rendimento motor é de 20% a 27% menor do que a gasolina, e para compensar esse diferencial, o preço frente à gasolina deve ser menor (ANP, 2016).

A produção nacional em 2010 foi de 27,9 bilhões de litros de etanol, um grande aumento em relação ao volume de 2002/2003 (12,5 bilhões de litros), antes da introdução dos veículos *flex-fuel* e desde então é possível fazer a escolha do tipo de combustível de acordo com o preço (MME, 2016). Desde março de 2015, a partir da publicação da Portaria nº 75 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, toda gasolina comum e aditivada vendida em território brasileiro apresenta um percentual obrigatório de 27% de etanol anidro e a gasolina premium, adição de 25% deste álcool (ANP, 2016). Atualmente, o país tem sido líder no uso de combustíveis renováveis, possuindo 851 milhões de hectares de área total, dos quais cerca de 8 milhões são utilizados para plantações de cana-de-açúcar (CONAB, 2016). No Brasil, 44,1% da energia fornecida é de origem renovável, uma das maiores proporções mundiais, contrastando significativamente com a média mundial, de 13,3%, e mais ainda com a média dos países que compõem a Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômicos, em sua grande maioria países desenvolvidos de apenas 8% (EPE, 2016).

A Tabela 2 aponta os avanços na produção de etanol para os próximos anos, indicando que no período de 2020/2021 serão produzidos aproximadamente 65,3 milhões de toneladas de etanol, sendo 49,6 milhões de toneladas voltados para o consumo interno e 15,7 milhões de toneladas à exportação (COGEN, 2016).

**Tabela 2.** Perspectivas da Produção de Etanol.

|  | 2008/2009 | 2015/2016 | 2020/2021 |
|--|-----------|-----------|-----------|
| Produção de cana de açúcar<br>(milhões de toneladas) | 562       | 829       | 1.038     |
| Etanol<br>(bilhões de litros)                        | 27,0      | 46,9      | 65,3      |
| Consumo interno                                      | 22,0      | 34,6      | 49,6      |
| Excedente para exportação                            | 4,8       | 12,3      | 15,7      |

Fonte: COGEN (2016).

### 3.3 Propriedades e aplicações do etanol

O etanol ou álcool etílico ( $C_2H_5OH$ ) é caracterizado como um líquido incolor, de odor ardente, facilmente inflamável, de chama azulada e bastante higroscópico. No estado desidratado é solúvel em diversas substâncias orgânicas e minerais, como ésteres, carburantes, acetonas, etc., e sua solubilidade diminui com o aumento da presença de água. O álcool etílico pode ser obtido de duas diferentes formas: por síntese química ou por fermentação. Na síntese química, o etanol é gerado a partir de hidrocarbonetos insaturados (eteno e etino), e de gases de petróleo e hulha. Tal processo tem significado econômico apenas em países com grandes reservas de petróleo e indústria petroquímica avançada. Obviamente, o etanol obtido desta forma não vem de matéria-prima renovável, portanto, não pode ser considerado como combustível alternativo. Assim, a via fermentativa é o método utilizado na obtenção de etanol no Brasil e na maioria dos países, onde o processo consiste no preparo do substrato, fermentação e destilação (MASIERO; LOPES, 2008). Seu emprego está centrado basicamente na geração energética, sendo utilizado direto como combustível ou misturado com a gasolina, onde este composto apresenta grande importância na matriz energética mundial (ANP, 2016). No entanto, sua utilização é muito mais ampla do que simplesmente a produção de energia. O etanol é utilizado ainda como solvente, componente de formulações médicas, na indústria de higiene e limpeza, alimentícia e muitas outras de origem química, petroquímica ou biotecnológica. É utilizado também como matéria prima em processos de produção de ácidos orgânicos, éteres, hidrocarbonetos, óxidos e síntese de biopolímeros (MASIERO; LOPES, 2008).

O etanol também vem sendo cada vez mais utilizado como combustível alternativo no setor de transporte, apresentando um índice de octanagem superior ao da gasolina e tem uma pressão de vapor inferior, resultando em menores emissões evaporativas. A combustão no ar é inferior à da gasolina, o que reduz o número e a severidade de fogo nos veículos. O Brasil foi o primeiro país a dispensar o emprego do chumbo tetraetila de sua matriz de combustíveis em 1992, graças ao uso do álcool como aditivo à gasolina, conferindo a esta poder antidetonante. Assim, o álcool revela-se um bom substituto ao chumbo tetraetila (MTBE), mitigando os efeitos danosos provocados ao meio ambiente por esse aditivo anteriormente utilizado (MASIERO; LOPES, 2008).

Contudo, um aumento dramático na produção de etanol utilizando culturas-base alimentícias (cana-de-açúcar, milho, beterraba) pode não ser viável por que essas mesmas

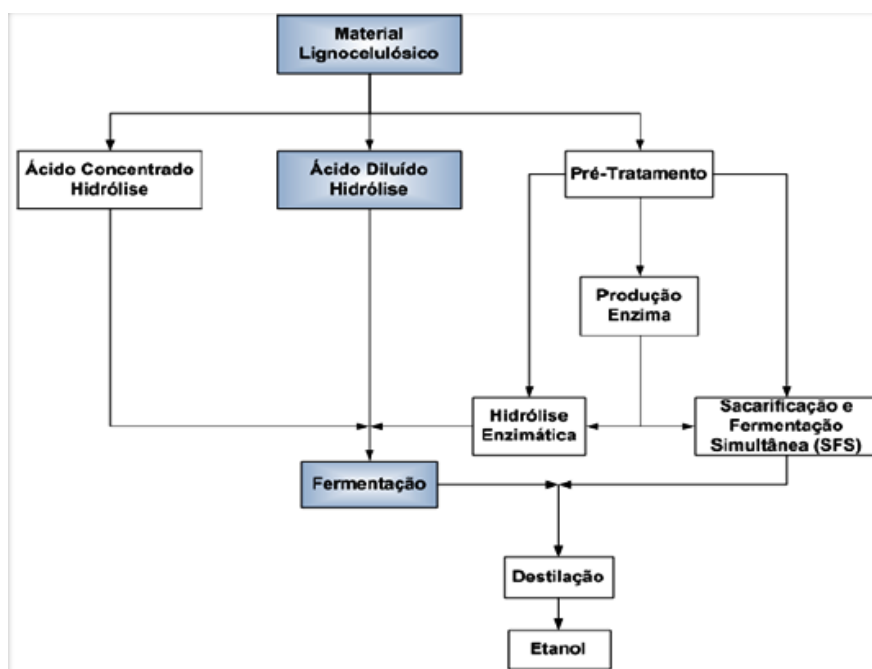
culturas são importantes suprimentos da dieta cotidiana. Assim, a expansão da produção de etanol combustível utilizando estas culturas poderia levar a escassez e aumento de preços na alimentação humana e animal (GUPTA; VERMA, 2015). Adicionalmente, tem sido relatado que o etanol celulósico e o produzido a partir de outros recursos de biomassa possuem potencial para reduzir as emissões de gases de efeito estufa em até 86% (MACEDO, 2007).

### **3.4 Etanol celulósico: Produção e Perspectivas**

Qualquer matéria-prima orgânica passível de ser transformada em energia pode ser classificada como biomassa, onde o Brasil se destaca como um dos maiores produtores agrícolas do mundo, e conseqüentemente, capaz de gerar grandes quantidades de rejeitos e resíduos agroindustriais. Conseqüentemente, a não utilização dessa biomassa leva a um desperdício energético. A disponibilidade de palhas, folhas, resíduo de exploração madeireira, rejeitos agrícolas e outros, tem despertado o interesse para seu uso como matéria-prima na produção de bioetanol, mais precisamente o etanol de segunda geração, processo no qual os açúcares fermentescíveis, por não se encontrarem solúveis como na fermentação do caldo de cana-de-açúcar (etanol de primeira geração), precisam ser previamente hidrolisados (MOJOVIC et al., 2006; SASSNER et al., 2006; SHARMA et al., 2007). O processo de obtenção de etanol celulósico consiste em desestruturar a parede celular vegetal lignocelulósica (despolimerização) para que os polissacarídeos possam ser utilizados como fonte de açúcares fermentescíveis. Durante o processo de desestruturação devem ser preservados os monossacarídeos para eventual fermentação. No entanto, a necessidade de obtenção de altas concentrações de açúcares fermentescíveis sem gerar elementos tóxicos à fermentação tem dificultado o emprego desses resíduos (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007). A hidrólise ácida é utilizada com maior frequência para desmontar a parede celular, sendo, portanto, um processo fundamental (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010; BALAT, 2011).

Para a produção de etanol utilizando hidrolisados lignocelulósicos é necessário que ocorram as seguintes etapas: 1- degradação da estrutura lignocelulósica de matérias primas para que os substratos fermentescíveis sejam liberados; 2- fermentação e 3- destilação do mosto fermentado (SIMS et.al., 2010), conforme o fluxograma mostrado na Figura 3.

**Figura 3** - Processo de produção do etanol de segunda geração.



Fonte: Adaptado de SIMS et al. (2010).

Somente nos últimos anos o Brasil começou a se inserir na realidade mundial dos biocombustíveis avançados como, por exemplo, o etanol celulósico produzido a partir do bagaço e palha da cana-de-açúcar. O país atualmente dispõe de duas plantas em escala comercial para produção de etanol celulósico, nos estados de Alagoas e São Paulo (EPE, 2016). O Plano Conjunto BNDES-FINEP de Apoio à Inovação Tecnológica Industrial dos Setores Sucroenergético e Sucroquímico lançado em 2011 pelo Governo Federal gerou um estímulo à indústria sucroalcooleira com um orçamento de um bilhão de reais de crédito para o desenvolvimento, implementação e avanço das tecnologias referentes à produção de etanol oriundo de matrizes lignocelulósicas, à eficiência da cogeração e aos novos bioprodutos (BNDES, 2016). Estimativas preveem que a capacidade produtiva de etanol celulósico no Brasil possa atingir nos próximos anos 429 milhões de litros, distribuídos em sete plantas construídas e em fase de construção, onde as capacidades, datas de início operacional e as localizações podem ser conferidas na Tabela 3 (EPE, 2016). Tais avanços incidem na necessidade de amplas pesquisas para contribuir em melhorias no processo de produção do etanol celulósico, para que estas destilarias processem não só o bagaço e palha de cana-de-açúcar, mas também se voltem para o uso e valorização de outros resíduos potenciais na geração de biocombustíveis renováveis, como é o caso de resíduos de industrialização da mandioca.

**Tabela 3.** Capacidade produtiva de etanol celulósico no país.

| <b>Empresa(s)</b>        | <b>Cidade (UF)</b>         | <b>Capacidade Nominal<br/>(milhões de litros)</b> | <b>Operação</b> | <b>Investimentos<br/>(milhões de reais)</b> |
|--------------------------|----------------------------|---|-----------------|---|
| Granbio/Carlos Lyra      | São Miguel dos Campos (AL) | 82  | 2014/15         | 350   |
| Raízen <sup>(1)</sup>    | Piracicaba (SP)            | 160   | 2015/16         | 710   |
| Odebrecht Agroindustrial | Sem definição              | 80  | 2016/17         | Sem definição                               |
| Petrobras/São Martinho   | Quirinópolis (GO)          | 40  | Sem definição   | 240   |
| CTC                      | São Manoel (SP)            | 3   | 2014/15         | 71  |
| Abengoa                  | Pirassununga (SP)          | 64  | 2017            | 310   |
| <b>Total</b>             |                            | <b>429</b>  |                 | <b>1.680</b>                                |

Notas: (1) Duas plantas da Raízen. A empresa anunciou, no fim de 2014, o projeto de sua segunda planta de etanol 2G. A previsão é um incremento na capacidade adicional de 120 milhões de litros anuais. A companhia pretende operar, até 2024, oito plantas de etanol 2G. No total, os aportes previstos até 2024 deverão chegar a R\$ 2,5 bilhões, entretanto este valor ainda não possui financiamento governamental garantido, o que é um condicionante no planejamento da empresa. A capacidade total das oito usinas em operação será de 1 bilhão de litros, correspondendo a 50% da capacidade atual das plantas de primeira geração da empresa, segundo a própria Raízen

Fonte: EPE (2016).

Um grande obstáculo para o gerenciamento destas usinas, durante o período em estudo, consistirá na mudança do perfil de produção de açúcar, etanol convencional e bioeletricidade, para outro em que se produza, além destes, o etanol celulósico. O projeto considerado como o mais econômico será aquele que englobe tanto a produção convencional à de segunda geração, e usinas que implantaram recentemente a cogeração de alta eficiência poderão inicialmente ter dificuldades para fabricar o etanol de segunda geração em plantas comerciais justamente porque, neste caso, quase todo o bagaço da cana-de-açúcar já está comprometido, e terão que utilizar a palha e ponta da cana, ou então lançar mão de outros resíduos agroindustriais com potencial para produção de etanol celulósico (EPE, 2016).

O ano de 2015 ficou marcado na produção do etanol celulósico, onde se inaugurou nos EUA as três maiores instalações mundiais em escala comercial, que juntas apresentam capacidade de produzir 75 milhões de galões de etanol celulósico (aproximadamente 285 milhões/l) anualmente. São elas: as instalações da Abengoa em Hugoton, Kansas, que gera etanol celulósico a partir de resíduos agrícolas de origem local, enquanto que a biorrefinaria DuPont em Nevada, Iowa, também utiliza resíduos agrícolas, como talos de milho, e adicionalmente, as instalações INEOS Bio em Vero Beach, Flórida, utiliza madeira e resíduos vegetais para tal finalidade (RFA, 2016). O futuro, portanto, está na produção de biocombustíveis da segunda geração, a partir da próxima década, onde o etanol produzido de bagaço, celulose e outras matérias orgânicas, fará com que a produtividade seja aumentada em 40%-50%. Essa produção de segunda geração esta em consonância com o meio ambiente e inicia uma “civilização moderna de biomassa”. Assim, a pressão pelo uso da terra e os conflitos de interesse ligados à produção de biocombustíveis certamente serão diminuídos, tornando os países cada vez mais independentes energeticamente, abrindo horizontes para

uma reforma agrária bem concebida, assegurando tanto o trabalho de pequenos agricultores como a alta biodiversidade (KOHLHEPP, 2010).

### 3.5 Microrganismos produtores de etanol

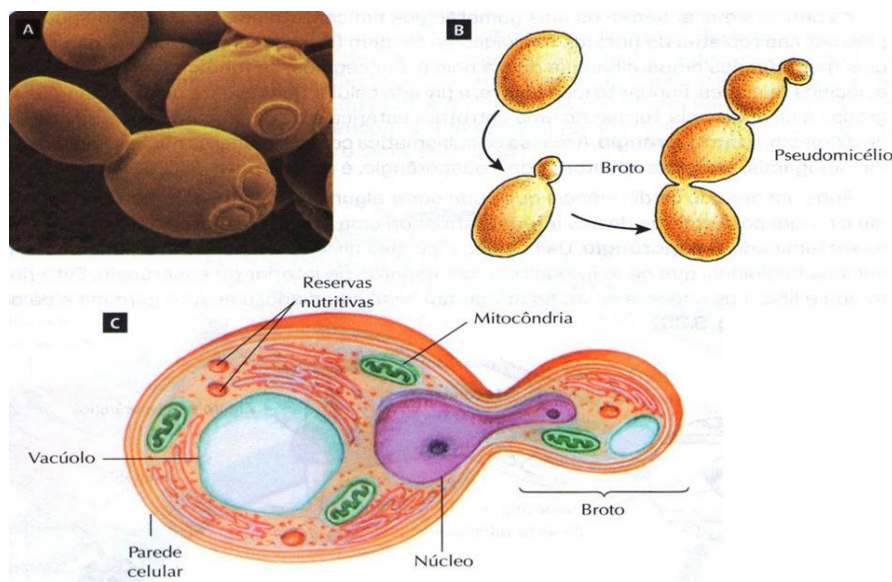
O etanol pode ser produzido através de processos fermentativos realizados por bactérias ou leveduras que utilizam diferentes tipos de açúcares, como a glicose, frutose, manose, xilose e arabinose, que posteriormente são metabolizados e convertidos em etanol (ROSSI et al., 2014). Existem diversos gêneros de microrganismos produtores de bioetanol, dentre os quais os mais utilizados são as leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Pachysolen*; fungos filamentosos: *Fusarium*, *Mucor*, *Monilia* e *Paecilomyces*; e bactérias: *Clostridium*, *Bacillus*, *Thermoanaerobacter*, *Klebsiella* e *Zymomonas mobilis* (CHISTI, 1999; LIMA; RODRIGUES, 2007; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009; CADETE et al., 2009), sendo esta última a espécie bacteriana que possui maior capacidade de produzir etanol (FU et al., 2009; HE et al., 2014; NURHAYATI et al., 2016). Outra espécie que também tem sido estudada por apresentar potencial para produzir etanol é a *Klebsiella pneumoniae*. No entanto, as melhores produções de etanol são obtidas pelas leveduras (ROSSI et al., 2014).

#### 3.5.1 *Saccharomyces cerevisiae*: Características da levedura

Durante as últimas décadas, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* se tornou um dos organismos produtores de etanol favoritos em biotecnologia industrial, principalmente devido a sua robustez em processos industriais e sua fácil acessibilidade para manipulação por engenharia genética (BORODINA; NIELSEN, 2014). É uma espécie que vem sendo utilizada há milhares de anos na panificação e na fermentação de bebidas alcoólicas, sendo considerada uma levedura fermentativa por excelência (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000). Ela é extremamente importante como organismo modelo em estudos fisiológicos e na área de biologia celular e molecular, sendo considerado o organismo eucariótico mais estudado e inclusive seu genoma foi também o primeiro a ser sequenciado (WILLIAMS, 1996). As colônias desta levedura variam entre o branco e o creme e suas estruturas podem ser convexas ou lisas. Além destas características, podem formar pseudomicélios, que são cadeias simples de células esféricas, elipsoidais ou cilíndricas. Sua reprodução quase sempre é por brotamento

multilateral, onde uma nova gêmula é formada na porção lateral da célula-mãe (Figura 4). A reprodução por conjugação de células individuais leva á formação do asco, onde sua composição pode variar de um a quatro ascósporos lisos e apresentar forma oval ou redonda em cada célula (WALKER, 1998).

**Figura 4 - Estrutura celular de levedura.**



A. Micrografia de *Saccharomyces cerevisiae* em brotamento ao microscópio eletrônico de varredura (5.200x). B. Representação esquemática dos estágios de brotamento (gemulação) em que os brotos permanecem unidos, produzindo um cordão de células interligadas (pseudomicélios). C. Representação esquemática da estrutura interna de levedura formando um broto. Fonte: Adaptado de WALKER (1998).

As espécies selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* podem ser encontradas em caules e colmos da cana-de-açúcar. Estas cepas apresentam capacidade de se desenvolver em ambientes diversos devido à habilidade de realizar respiração aeróbia e fermentação (anaerobiose). Suas células se apresentam em cadeias, colônias opacas e superfícies crespas. Durante o processo de fermentação podem apresentar fenótipos como floculação, formação de espumas, pseudomicélios e capacidade de formar biofilme (ROMANO; SUZZI; VANNINI, 1994; JIN; SPEERS, 1998; MADIGAN et al., 2009).

Estirpes de *S. cerevisiae* apresentam características específicas, extremamente importantes como o rápido crescimento, alta eficiência fermentativa, eficiente metabolização de açúcares, habilidade na produção, tolerância a altas concentrações de etanol e baixos níveis de oxigênio, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura e atividade celular em ambientes ácidos, o que as tornam microrganismos adequados para a operação em escala industrial na produção de álcool (ANDRIETTA et al., 2007). Conhecendo-se as propriedades fisiológicas e exigências nutricionais desta levedura, podem-se propiciar condições ótimas

para esse microrganismo e favorecer a fermentação alcoólica, a fim de que esta seja mais regular, homogênea e pura. As cepas mais utilizadas para a produção de álcool são as de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis* (PELCZAR et al., 1997). Tais microrganismos apresentam maior eficiência na produção de etanol, sendo utilizados em diversas aplicações biotecnológicas, como por exemplo, na produção de bebidas alcoólicas, como cerveja e vinho (HIRASAWA; FURUSAWA; SHIMIZU, 2010). A maioria das linhagens de *S. cerevisiae* é tolerante a baixos valores de pH, altas concentrações de açúcares e de etanol, propriedades que contribuem na diminuição do risco de contaminação durante a fermentação industrial (NEVOIGT, 2008). Linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* são amplamente utilizadas pelo setor sucro-energético brasileiro por possuírem uma combinação de alta eficiência fermentativa com prolongada persistência na safra. Algumas destas linhagens tornaram-se disponíveis comercialmente desde o final da década de 1990 (BASSO et al., 2008).

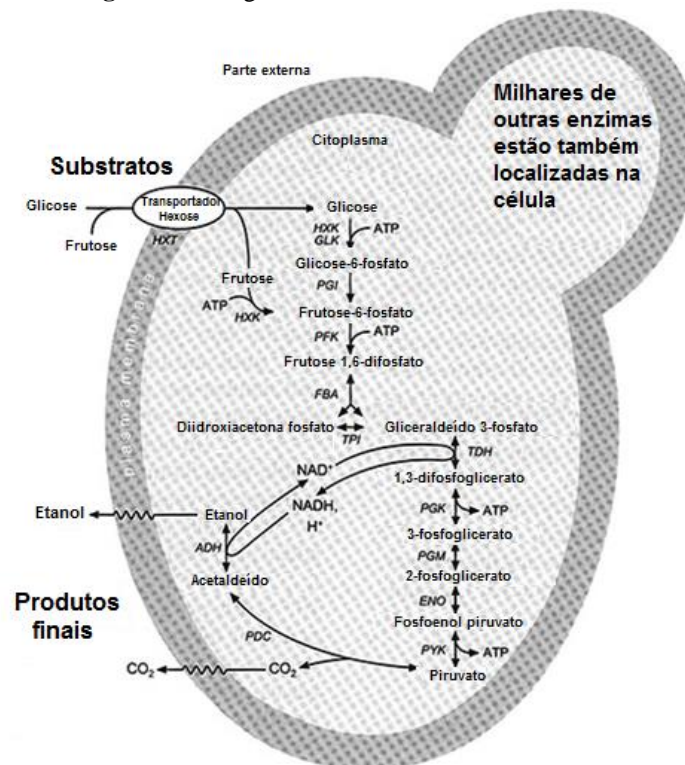
### 3.5.2 Fatores que afetam o metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol

Existem diversos tipos de leveduras fermentativas que consomem a glicose para a produção de etanol e dióxido de carbono. Contudo, *S. cerevisiae* se destaca pela velocidade com que fermenta e pela concentração de etanol que pode atingir. O estado metabólico da levedura é tal que uma pequena quantidade de oxigênio torna-se uma exigência absoluta, pois esta pequena quantidade de O<sub>2</sub> presente no meio é suficiente para garantir que a levedura possa sintetizar ambos os ácidos graxos insaturados e esteróis necessários para a síntese de membrana celular durante o crescimento (BOULTON et. al., 1996; PRETORIOUS, 2000). Como demonstrado na Figura 5, o açúcar entra na célula e sofre reação pelas inúmeras enzimas envolvidas no metabolismo central de açúcares, que convertem a glicose através da via glicolítica em piruvato, que é posteriormente transformado em dióxido de carbono e acetaldeído, e em seguida, a etanol pela álcool-desidrogenase. Por fim, o etanol formado deixa a célula por difusão. As células de levedura requerem ATP, que é a principal fonte energética para o crescimento e transformação metabólica celular. O crescimento de células leveduriformes não ocorre a menos que a produção metabólica de ATP aconteça através da glicólise ao passo que o etanol é produzido. No intermédio do processo, a molécula de glicose resulta na formação de piruvato:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3COCOO^- + 2H^+$ . Durante esta reação duas moléculas de NAD<sup>+</sup> são reduzidas para NADH e duas moléculas de ADP fosforiladas



originando um saldo de dois ATP, onde duas moléculas de água são também liberadas na reação. O piruvato é então convertido em dióxido de carbono e acetaldeído (pela ação da piruvato descarboxilase). Subseqüentemente, o acetaldeído é reduzido a etanol pelo NADH (da glicólise prévia), retornando à forma  $\text{NAD}^+$  conforme a reação:  $\text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} \rightarrow \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{NAD}^+$ . Na via glicolítica, resumidamente, uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de etanol, duas moléculas de dióxido de carbono e energia:  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{ATP}$  (BOULTON et. al., 1996).

Figura 5 - Via glicolítica da levedura *S. cerevisiae*.



Fonte: Adaptado de BOULTON et al. (1996).

Segundo Fernandes (2008) estirpes de *S. cerevisiae* chegam a produzir cerca de 20% v/v etanol, enquanto a maioria das outras leveduras fermentativas deixa de crescer e/ou de fermentar a partir de 6% v/v. Em geral os microrganismos são influenciados por uma série de fatores ambientais, físicos, químicos e biológicos que podem interferir na sua sobrevivência, produção de massa celular e produção de metabólitos de interesse, como o etanol. Assim, verifica-se que diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação do meio, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação microbiana) afetam o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar em etanol. Geralmente as quedas na

eficiência fermentativa resultam de alterações no equilíbrio dinâmico, levando à maior formação de produtos secundários (especialmente glicerol, ácidos orgânicos e biomassa), ou por contaminação de outros microrganismos que competem pelo substrato para produção de outros metabólitos (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

Uma pesquisa desenvolvida com o propósito de manipular certa linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* para consumir simultaneamente dois açúcares mais abundantes encontrados em plantas (glicose e xilose), validou o processo para tornar a produção de biocombustível mais rápida, barata e eficiente (ROMANÍ et al., 2015). No cenário presente, algumas indústrias de biocombustíveis utilizam estas estirpes geneticamente modificadas para transformar açúcares vegetais em bioetanol. Embora a *S. cerevisiae* selvagem seja adepta a utilização da glicose, ela não é capaz de metabolizar xilose, um dos principais componentes da lignocelulose encontrada em caules e folhas (ROMANÍ et al., 2015; LI et al., 2016). Um estudo mostrou que a célula de *S. cerevisiae* utilizou sua própria reserva de carboidratos ao invés de xilose quando a glicose foi totalmente consumida em hidrolisados lignocelulósicos contendo xilose (DE BARI et al., 2014).

A co-cultura de *S. cerevisiae* que assimila hexoses com leveduras que produzem etanol eficiente a partir de pentoses, como *P. stipitis*, também é uma alternativa na otimização da produção de etanol em hidrolisados contendo xilose (TESFAW; ASSEFA, 2014). Co-cultura de *S. cerevisiae* ITV-01 e *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 foi investigada por Gutiérrez-Rivera et al. (2012), onde obtiveram aumento de cinco vezes a produção de etanol em comparação com as monoculturas avaliadas isoladamente. Recentemente, Zu et al. (2016) desenvolveram duas cepas *S. cerevisiae*, uma capaz de utilizar xilose e outra resistente a inibidores e as utilizaram em co-cultura. Tais pesquisadores obtiveram neste estudo um aumento de 21,2% e 41% na concentração de etanol para as respectivas cepas isoladas (aumento de 41,7 g L<sup>-1</sup> e 48,5 g L<sup>-1</sup> para 58,8 g L<sup>-1</sup> de etanol utilizando de forma combinada as cepas), sugerindo que este sistema de co-cultura foi bastante promissor. Outra abordagem recente melhorou a tolerância de *S. cerevisiae* ao etanol quando se aplicou culturas mistas com *Kluyveromyces lactis* em altas concentrações de açúcares. Tais autores verificaram que o tempo de vida cronológica da levedura foi menor em cultura pura do que na cultura mista, do mesmo modo que foi mais tolerante ao etanol quando colocada em cultura mista do que em cultura pura. Concluíram que a co-cultura com *K. lactis* levou a tolerância de *S. cerevisiae* frente ao etanol através da formação de metabólitos como glicerol e alanina, e pela mudança na *pool* de aminoácidos intracelulares (YAMAOKA; KURITA; KUBO, 2014).

### 3.5.3 Estirpe como alvo de modificações genéticas

*Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo modelo em pesquisas e vastamente investigado, o que auxilia na elucidação da biologia celular eucariótica e, em última análise, na extrapolação para a biologia humana. Durante vários séculos ela tem sido utilizada na produção de alimentos e bebidas alcoólicas, e inclusive hoje é empregada em inúmeros processos dentro da indústria farmacêutica. Considerado um organismo atraente para se trabalhar, uma vez que não é patogênico, e devido ao seu longo histórico de aplicação em produtos consumíveis, tais como o etanol e fermento de pão, foi classificada como um organismo GRAS (*generally regarded as safe*). Outra razão importante para a aplicabilidade de *S. cerevisiae* no campo biotecnológico é sua susceptibilidade a modificações genéticas por tecnologia de DNA recombinante, que foi ainda mais facilitada pela disponibilidade da sequência completa do genoma da levedura, publicada em 1996 (GOFFEAU et al., 1996).

Desenvolvimentos de métodos sofisticados no domínio da tecnologia de DNA recombinante permitiram manipular uma determinada via de interesse e, portanto, melhorar a célula para abordagens direcionadas. Assim, tornou-se possível introduzir “perturbações” genéticas específicas em termos de modificar a força promotora (expressão) de um dado gene, executar supressões ou ainda introduzir novos genes ou vias inteiras para o interior da célula. Melhorias dirigidas nas propriedades celulares obtidas a partir de informações bioquímicas e da aplicação da engenharia genética têm sido referidas como engenharia metabólica (BAILEY, 1991; STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU; NIELSEN, 1998). A técnica é bem aplicada nas tentativas para alargar o intervalo de substratos a serem consumidos pelo microrganismo, por exemplo. O primeiro passo é introduzir genes de expressão heterólogos que permitem o metabolismo do substrato de interesse, e para este efeito, é relevante considerar duas estratégias: (I) introdução do gene que codifica para uma proteína de membrana que permitirá o transporte do substrato para o interior da célula; (II) introdução do gene que codifica uma proteína (enzima) que será segregada para o meio extracelular, se necessário, para que o substrato seja clivado em produtos mais simples permitindo então a assimilação pelo organismo hospedeiro. Independente da estratégia escolhida é importante garantir que o gene heterólogo seja expresso suficientemente no novo sistema hospedeiro, o que pode envolver possíveis modificações pós-traducionais (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000). Uma vez construído o organismo recombinante capaz de utilizar o

substrato de interesse, muitas vezes ele acaba apresentando baixos rendimentos em termos de produto, sendo necessário realizar uma análise detalhada da fisiologia da célula. Além disso, os níveis de metabólitos podem interagir com a expressão gênica e por outro lado, a expressão do gene pode determinar os níveis de metabólitos, através da concentração da enzima. Por isso, em muitos casos várias modificações são necessárias, e para cada modificação pode haver mudanças inesperadas no metabolismo central da levedura. Isto é devido à complexidade do metabolismo celular, claramente ilustrado na tentativa de converter a xilose em etanol por fermentação anaeróbica de *S. cerevisiae* (CAMERON; TONG, 1993). A manipulação da via do metabolismo central da *Saccharomyces* tem sido utilizada para aumentar o rendimento de etanol e a produtividade. Um estudo relatou que a sobre-expressão de fosfofrutoquinase melhora a produtividade de etanol no caso de células em repouso imobilizadas crescidas aerobicamente, mas não em condições anaeróbicas (DAVIES; BRINDLE, 1992). Estes resultados ilustram a rigidez no controle do fluxo através do metabolismo central do carbono em leveduras.

A extensão da gama de substratos passíveis de serem utilizados por este microrganismo é uma opção importante na utilização de novas fontes de carbono, por exemplo, produtos residuais agrícolas, para a produção em larga escala de produtos biotecnológicos, bem como na diminuição do conteúdo biológico em um processo industrial. Muitos exemplos de ampliação da faixa de substrato são descritos na literatura, uma vez que o redirecionamento do fluxo para obter um rendimento melhorado de um dado produto (etanol) torna-se essencial com a extensão da faixa de substrato com a finalidade de incluir novas matérias-primas desejadas para que a levedura seja capaz de convertê-las em subprodutos de interesse.

#### 3.5.3.1 Utilização de amido

O amido é o carboidrato de armazenamento em plantas, servindo como importante fonte de energia e carbono em processos biotecnológicos. O amido é constituído por longas cadeias de glicose unidas por ligação  $\alpha(1\rightarrow4)$  e elos de ramificação unidos por ligações  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Muitos microorganismos, incluindo *S. cerevisiae*, são incapazes de degradar amido, uma vez que não produzem enzimas amiláceas, tais como  $\alpha$ -amilase (cliva ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$ ),  $\beta$ -amilase (cliva a partir de unidades de maltose a extremidade não redutora de amido), a pululanase ou isoamilase (enzimas desramificadoras capazes de hidrolisar ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow6)$ ), e glucoamilase (que hidrolisa unidades de glicose finais não redutoras

do amido). Uma alternativa seria usar estirpes recombinantes que produzem enzimas que clivam o amido com a finalidade de se utilizar esta fonte de carbono (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

Na indústria cervejeira é de interesse utilizar estirpes recombinantes de *S. cerevisiae* que segregam glucoamilases pelos quais os oligômeros maiores (dextrinas), formados a partir da hidrólise parcial do amido de cevada, são decompostos. A expressão de glucoamilase de *Aspergillus awamori* em *S. cerevisiae* já foi demonstrada com sucesso, mas a estirpe transformada cresceu em dextrina a uma taxa menor do que a observada quando glucoamilase foi adicionada externamente ao meio (INNIS et al., 1985). Outro estudo demonstrou a expressão do gene de *Saccharomyces diastaticus* STA2 (que codifica uma glucoamilase) e AMY1 (que codifica uma  $\alpha$ -amilase) de *Bacillus amyloliquefaciens* para aumentar sinergisticamente a degradação do amido (STEYN, PRETORIUS, 1991). *S. cerevisiae* não pode utilizar materiais ricos em amido sem processos de liquefação e sacarificação prévios, que são caros e demorados. Para reduzir o custo da produção de etanol a partir de amido, os investigadores têm desenvolvido leveduras recombinantes fermentadoras de etanol capazes de expressar enzimas amilolíticas (YAMAKAWA et al., 2012).

### 3.5.3.2 Utilização de xilose

A xilose é considerada o segundo açúcar mais abundante na natureza (após a glicose) e está presente na matriz de vegetais como parte do polímero de hemicelulose, um carboidrato lignocelulósico considerado *low-cost*, bem como renovável, e devido à sua abundância na natureza, é potencialmente atraente para a produção de produtos de valor agregado. A produção de etanol para ser utilizado como combustível líquido é um exemplo bem descrito (BEALL; OHTA; INGRAM, 1991; LAWFORD, ROUSSEAU, 1993; HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; OLSSON, HAHN-HÄGERDAL, 1996; WATANABE et al., 2007; ZHANG, GENG, 2012; ZHANG W. et al., 2014; VILELA et al., 2015).

Para se projetar um processo economicamente viável, o rendimento em etanol deve ser próximo ao valor teórico máximo (0,51 g de etanol por g de glicose ou xilose) (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000). Para maximizar este rendimento, o organismo de produção deve ser capaz de utilizar todas as pentoses e hexoses presentes na lignocelulose, e, além disso, é importante que o organismo de produção tenha uma tolerância alta aos compostos tóxicos, uma vez que os hidrolisados lignocelulósicos contêm substâncias

inibidoras. Dependendo da natureza do inibidor, a toxicidade pode ser removida pela utilização de uma variedade de métodos de detoxificação, mas isso pode aumentar muito o custo operacional (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; TESFAW; ASSEFA, 2014).

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica na última década tem sido vista como uma fonte de energia alternativa promissora. *Saccharomyces cerevisiae* é o microorganismo preferido utilizado para produzir o etanol devido à sua excelente capacidade para fermentar a glicose, além da sua elevada tolerância ao etanol e inibidores apresentados em hidrolisados lignocelulósicos (STAMBUK et al., 2008). No entanto, ela não é capaz de fermentar xilose, presente em quantidades significativas no hidrolisado de biomassa. Em *S. cerevisiae*, xilose é convertida em xilulose através de duas enzimas que utilizam diferentes cofatores, levando a um desequilíbrio redox que, conseqüentemente, impede a fermentação de xilose. Duas estratégias principais têm sido aplicadas para resolver este problema: a clonagem de uma xilose redutase e xilitol desidrogenase que estão ligadas à mesma coenzima ou a clonagem de uma xilose isomerase que converte diretamente a xilose no isômero xilulose. No entanto, as leveduras modificadas através dessa estratégia para fermentar a xilose ainda a fazem lentamente e acumulam xilitol (KIM et al., 2012). Além da abordagem de engenharia metabólica, a engenharia evolutiva tem sido utilizada para melhorar o desempenho da célula para a produção de etanol e para aumentar a estabilidade das estirpes recombinantes (CAI et al., 2012; ABREU-CAVALHEIRO; MONTEIRO, 2013).

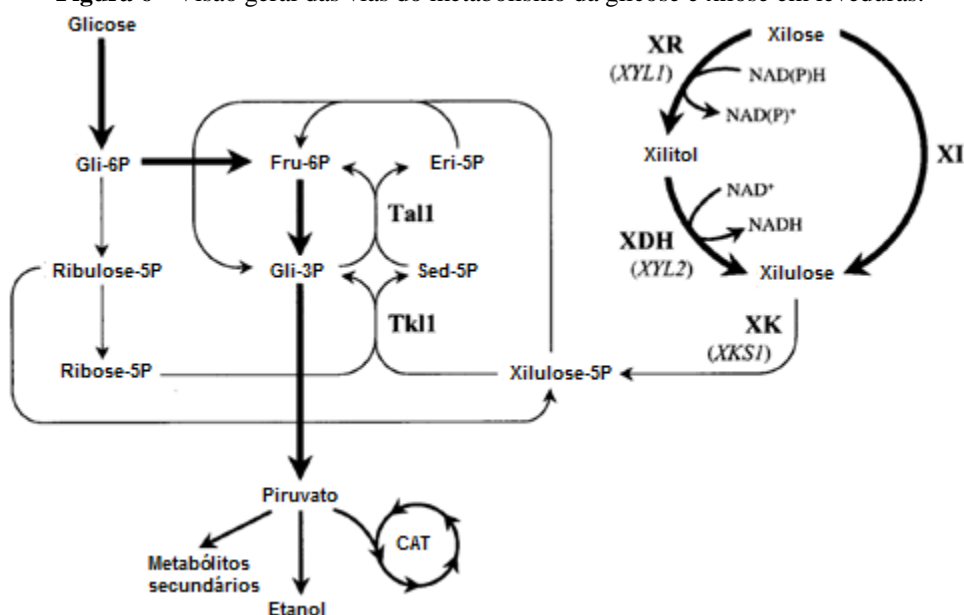
A conversão simultânea de xilose e glicose é outro gargalo para a produção econômica de etanol a partir de hidrolisados de biomassa (HA et al., 2011). Leveduras modificadas para fermentar a xilose não são capazes de consumir xilose até que a glicose esteja completamente esgotada. Uma explicação possível para este fenômeno é que a glicose reprime a expressão de genes necessários para o catabolismo de xilose por meio de um fator de transcrição MIG1 importante e essencial para o processo de repressão catabólica. Na presença de níveis elevados de glicose, MIG1 move-se rapidamente a partir do citoplasma para o núcleo e se liga aos genes promotores repressores de glicose. Quando as células estão privadas de glicose, MIG1 é transportado de volta para o citoplasma (ROLLAND; WINDERICKX; THEVELEIN, 2002). O uso sequencial de xilose após o esgotamento da glicose também pode ser atribuído à competição entre xilose e glicose durante a captação. Em *S. cerevisiae*, esta pentose é transportada via transporte facilitado mediado por hexose permeases que fazem o transporte de xilose com uma afinidade muito mais baixa em comparação ao transporte de

glicose (SUBTIL; BOLES, 2012). A descoberta de um transportador específico de xilose, que não é inibido por glicose e que apresenta elevada afinidade e capacidade de transporte pode melhorar o desempenho celular para fermentar a xilose em hidrolisados de biomassa (WEBER et al., 2010).

Existe uma boa abordagem na expansão da gama de substratos para permitir o consumo de xilose por *S. Cerevisiae* visando o desenvolvimento de processos para a produção de etanol em larga escala a partir de hemicelulose (HASUNUMA; ISHI; CONDO, 2015). Duas características são pré-requisitos necessários para que uma estirpe possa converter eficientemente a xilose em etanol: (a) expressão de genes heterólogos deve permitir converter xilose em xilulose; e (b) o consumo de xilulose deve ser melhorado em *S. cerevisiae*, uma vez que esta cresce em xilulose com uma taxa específica máxima de crescimento 10 vezes menor do que em meios contendo glicose (SENAC; HAHN-HÄGERDAL, 1990).

Apesar da *S. cerevisiae* não poder fermentar xilose nativamente, é capaz de metabolizar xilulose, um isômero da xilose, a etanol. Em alguns fungos e leveduras que utilizam xilose, xilose redutase (XR) dependente de NAD(P)H primeiro reduz xilose a xilitol, que é então oxidado a xilulose por xilitol desidrogenase (XDH) dependente de NAD<sup>+</sup>. E por fim, a xiluloquinase (XK) fosforila a xilulose para formar xilulose-5-fosfato, que é metabolizado pela via da pentose fosfato (PP). Em algumas espécies bacterianas e fúngicas, a xilose pode ser isomerizada diretamente em xilulose por xilose isomerase (XI) (CAI et al., 2012; LI et al., 2016). Em outras palavras, a xilulose entra na via pentose fosfato (PP) e depois é fosforilada por xiluloquinase (XK), que é codificada pelo gene XKS1, presente naturalmente em *S. cerevisiae*, e conseqüentemente é necessária uma elevada capacidade da via PP. Vários passos estão envolvidos no consumo de xilose: captação, conversão de xilose em xilulose, fosforilação de xilulose em xilulose-5-fosfato, e a conversão deste último através da via PP seguida por conversão subsequente a etanol a partir do piruvato, conforme a Figura 6. (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

**Figura 6** - Visão geral das vias do metabolismo da glicose e xilose em leveduras.



A via de Embden Meyerhof-Parnas e a via de utilização de xilose são ilustradas por linhas grossas. A via PP é indicada por linhas finas. Abreviaturas: CAT - ciclo do ácido trialifático; TkI - transcetolase; TalI - transaldolase; Glu-6P - glucose-6-fosfato; Fru-6P - frutose-6-fosfato; Gly-3P - gliceraldeído-3-fosfato; Ery-4P - eritrose-4-fosfato; Sed-7P - sedoheptulose-7-fosfato. Genes estão representados entre parênteses. Fonte: Adaptado de OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN (2000).

Nomeadamente, a xilose pode ser fermentada em etanol por muitas bactérias e leveduras, tais como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus*, mas a formação de subprodutos ou conversão lenta de xilose limita a sua aplicação econômica para produção de etanol, além do que a influência de produtos inibidores gerados durante a hidrólise ácida no crescimento e fermentação destes microrganismos é acentuada (WEBER et al., 2010; ZHANG W. et al., 2014). A principal estratégia utilizada na tentativa de modificar geneticamente *S. cerevisiae* para consumo de xilose envolveu a introdução de genes XYL1 e XYL2 originários de leveduras capazes de utilizar a xilose, por exemplo, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus*, e *Pichia stipitis* (HAHN-HÄGERDAL et al., 1993). O gene XYL1 que codifica a xilose redutase (XR) reduz a xilose a xilitol com o consumo de NAD(P)H. Além disso, a conversão de xilitol em xilulose com recrutamento de NAD<sup>+</sup> é obtida pelo gene XYL2, que codifica a enzima xilitol desidrogenase (XDH) (Figura 6). A estratégia de introdução de XYL1 e XYL2 de *P. stipitis* em *S. cerevisiae* não tem sido bem sucedida na produção de etanol devido ao crescimento limitado em xilose e a excreção de xilitol (KÖTTER, CIRIACY, 1993; TANTIRUNGKIJ et al., 1994). Em condições de crescimento aeróbio, xilose é convertida principalmente a biomassa, mas uma pequena quantidade de xilitol é também produzida. À medida que a levedura é cultivada em condições limitadas de oxigênio, ocorre um crescimento mais lento, a produção de etanol diminui, e o aumento da



produção de xilitol é observado (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000). Isto pode ser resultado de um desequilíbrio da proporção redox de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . O acúmulo de  $\text{NADH}$  e excreção de xilitol podem ocorrer uma vez que  $\text{NADH}$  não pode ser reoxidado suficientemente para  $\text{NAD}^+$  sob condições limitadas de oxigênio, além do que a enzima xilose redutase (XR) de *P. stipitis* usa preferencialmente  $\text{NAD(P)H}$  para conversão de xilose a xilitol (MEINANDER; ZACCHI; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Resultados promissores para a produção de etanol a partir de xilose foram relatados por um estudo onde realizaram a expressão dos genes *XYL1* e *XYL2* de *P. stipitis* em *S. cerevisiae*, em adição a uma sobre-expressão do gene da xiluloquinase *XKS1* da própria estirpe de *S. cerevisiae*, e que apresentou um rendimento em etanol de 0,32g de etanol por g de xilose e um rendimento baixo de xilitol de 0,10g de xilitol por g de xilose. Assim, a enzima xiluloquinase (responsável pela fosforilação da xilulose) parece exercer um controle considerável sobre o fluxo através desta rota bioquímica. Embora um alto rendimento de etanol tenha sido obtido, mais pesquisas devem perseguir o rendimento máximo teórico de 0,51 g de etanol por g de xilose (HO; CHEN; BRAINARD, 1998). Outro estudo de Vilela e cols. (2015) demonstrou recentemente que a expressão heteróloga do gene xilose isomerase bacteriana (*xylA*) de *Burkholderia cenocepacia* permitiu *Saccharomyces cerevisiae* de fermentar a xilose anaerobicamente, sem acumulação de xilitol, por meio de evolução adaptativa em série onde a estirpe recombinante foi pré-cultivada em meios suplementados com diferentes concentrações mistas de glicose e xilose por vários ciclos antes de ser transferida ao meio fermentativo, onde o rendimento e produtividade em etanol aumentou em 13% e 120%, respectivamente em comparação à estirpe não adaptada usada como controle, além do que observaram acúmulo de xilitol no meio de fermentação desta última.

Um dos principais desafios que emergem a partir da utilização de lignocelulose para a produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a fermentação eficiente de D-xilose e L-arabinose, devido ao fato destes açúcares não conseguirem ser utilizados por estirpes naturais deste microrganismo (WISSELINK et al., 2009), o que justifica extensas pesquisas demonstrando algumas melhorias genéticas em cepas de *S. cerevisiae* para que o organismo seja apto a consumir um vasto leque de substratos como pode ser demonstrado resumidamente na Tabela 4.

**Tabela 4.** Exemplos ilustrando a extensão da gama de substratos em *S. cerevisiae*.

| Substrato                                     | Comentários  | Referências                  |
|---|--|------------------------------|
| $\beta$ -glucanas                             | Introdução gênica de $\beta$ -glucanase de <i>Trichoderma reesei</i> → estirpe recombinante foi capaz de utilizar $\beta$ -glucanas resultando na melhoria da capacidade de filtração do mosto;  | PENTTILA et al., 1987.       |
| Lactose                                       | Genes que codificam lactose permeases (LAC12) e $\beta$ -galactosidase (LAC4) de <i>Kluyveromyces lactis</i> introduzidos em <i>S. cerevisiae</i> → conversão eficiente de lactose em etanol quando fermentado em biorreator contínuo;   | RUBIO-TEIXEIRA et al., 2001. |
| Lactose                                       | <i>S. cerevisiae</i> flocculante expressando genes LAC12 e LAC4 de <i>Kluyveromyces lactis</i> foi construída → estirpe capaz de consumir meio altamente concentrado (140g L <sup>-1</sup> de lactose) em apenas 36h, com produção de etanol de 63g L <sup>-1</sup> (84 % do rendimento teórico máximo).   | GUIMARÃES et al., 2008.      |
| Malato  | Degradação de malato é essencial na desacidificação do vinho, e devido à falta de malato permease e a baixa afinidade de malato pela enzima málica de <i>S. cerevisiae</i> , tal organismo foi metabolicamente projetado para utilização eficiente de malato → genes que codificam malato-permease MAE1 e MAE2 de <i>Schizosaccharomyces</i> + enzima málica de <i>Lactococcus lactis</i> mleS foram expressos em <i>Saccharomyces</i> .           | VOLSCHENK et al., 1997.      |
| Melibiose                                     | Estirpes de leveduras produtoras de melibiase foram construídas com sucesso pela introdução do gene MEL1 em <i>S. cerevisiae</i> por engenharia genética.  | VINCENT et al., 1999.        |
| Amido e dextrinas                             | Assimilação de amido de 99% foi conseguida pela co-expressão do gene STA2 de <i>Saccharomyces diastaticus</i> , AMY1 de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> e Pula de <i>Klebsiella pneumoniae</i> que codifica uma glicoamilase, $\alpha$ -amilase e pululanase, respectivamente.   | JANSE; PRETORIUS, 1995.      |
| Amido   | Dois plasmídeos (pRTI e PTI) foram construídos de modo a permitir a inserção de um gene bacteriano isoamilase (ISO) de <i>Pseudomonas amyloclavata</i> → levedura recombinante produtora de glicoamilase e isoamilase obteve a utilização de 95% de amido solúvel.   | MA et al., 2000.             |
| Amido   | Cepa de levedura exibindo tanto $\alpha$ -amilase e glicoamilase foi desenvolvida → produção de 46,5 g L <sup>-1</sup> de etanol a partir de 200 g L <sup>-1</sup> de amido de milho, após 120 h de fermentação. Foi observado também que em 23 ciclos repetidos de fermentação, não houve perda da atividade das enzimas.   | YAMAKAWA et al., 2012.       |
| Co-fermentação de xilose, glicose e arabinose | Genes XylA de <i>Piromyces</i> , XKS1 de <i>S. cerevisiae</i> e araA, AraB e AraD de <i>Lactobacillus plantarum</i> bem como os genes endógenos da via pentose fosfato (RPE1, RKI1, TKL1, e TAL1) sobre-expressos → <i>S. cerevisiae</i> (cepa IMS0003) capaz de fermentar misturas de glucose, xilose e arabinose com um rendimento elevado de etanol (0,43 g/g do total de açúcar) sem formação de produtos secundários como xilitol arabinitol. | WISSELINK et al., 2009       |
| Xilose  | Estirpe de <i>S. cerevisiae</i> transformada com genes PsXR e PsXDH de <i>Pichia</i> que codificam xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) respectivamente → levou a conversão de xilose em etanol, juntamente com a excreção desfavorável de xilitol. Aumento na produção de etanol de 20% e 52% de diminuição da excreção de xilitol, em comparação com a cepa selvagem usada no estudo.  | WATANABE et al., 2007        |

| (Continuação)                       |   |                      |
|-------------------------------------|---|----------------------|
| Substrato                           | Comentários   | Referências          |
| Xilose                              | Estirpe recombinante construída por integração cromossômica de XylA de <i>Clostridium phytofermentans</i> e posterior adaptação evolutiva da cepa em hidrolisados contendo xilose → atividade de xilose isomerase foi aumentada. Em meio sintético com 35 g L <sup>-1</sup> de D-xilose como fonte única de carbono, a estirpe evoluída consumiu toda a D-xilose disponível em ~17 h, com rendimento final de etanol de 0,46 g/g de D-xilose e o rendimento de xilitol inferior a 0,01 g/g de D-xilose. | DEMEKE et al., 2013. |
| Xilose e Glicose simultaneamente    | Estirpe recombinante de <i>Saccharomyces</i> PE-2, comumente usada na indústria brasileira de etanol → resultou num rendimento de etanol de 0,47g/g do total de açúcares, o que corresponde a 92% do rendimento teórico.  | ROMANÍ et al., 2015. |
| Xilose                              | Expressão funcional de xilose isomerase (XI) de <i>Pyromices ruminicola</i> na levedura → levou ao melhor desempenho na fermentação de xilose em etanol, onde após 48h de fermentação, a estirpe assimilou 16,95 g L <sup>-1</sup> de xilose e produziu 6,98 g L <sup>-1</sup> de etanol.   | LI et al., 2016.     |
| Xilitol                             | Mutantes assimiladores de xilitol isolados a partir de <i>Saccharomyces</i> recombinante → sequências de nucleotídeos dos genomas mutantes foram analisadas e comparadas com as das estirpes selvagens e os locais de mutação foram identificados → dados indicaram que foi necessário o gene Gal2 para assimilação de xilitol na estirpe selvagem.   | TANI et al., 2016    |
| Celobiose e lactose simultaneamente | Estirpe de <i>S. cerevisiae</i> modificada foi capaz de fermentar celobiose e lactose → constatou-se que o transportador de celobiose (CDT-1) pode transportar lactose, e β-glicosidase (GH1-1) pode hidrolisar a lactose agindo como uma β-galactosidase.  | LIU et al., 2016     |
| Glicerol                            | Uma fonte adicional de carbono que poderia ser considerada, mas até agora tem sido negligenciada por bioprocessos é o glicerol, subproduto do biodiesel e indústrias de bioetanol. A levedura <i>S. cerevisiae</i> mostra naturalmente uma baixa capacidade natural para utilizar glicerol como fonte única de carbono → engenharia metabólica com expressão heteróloga do gene FPS1 de <i>Cyberlindnera jadinii</i> promoveu crescimento melhorado da levedura frente ao glicerol.                     | SWINNEN et al., 2016 |

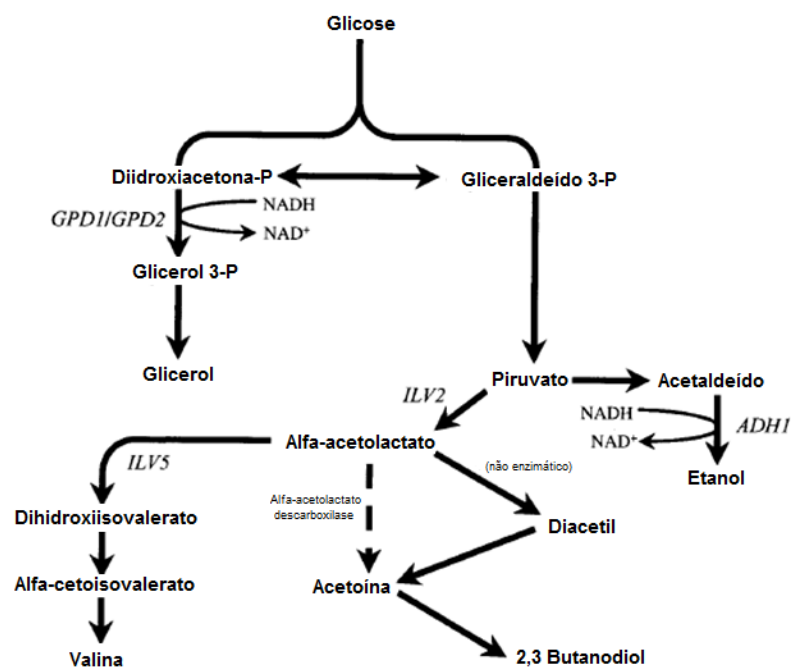
Fonte: O próprio autor.

### 3.5.4 Produção de etanol, melhoria no desempenho do processo e eliminação de subprodutos da fermentação

Um dos principais problemas com a produção de etanol por fermentação anaeróbica de *S. cerevisiae* é a formação substancial de glicerol como subproduto. Em condições de crescimento aeróbio, o NADH citosólico formado a partir de formação da biomassa pode ser reconvertido em NAD<sup>+</sup> através da formação de glicerol, ou ainda pela ação de desidrogenases mitocondriais externas, através de sistemas metabólicos ainda não bem elucidados (LUTTIK et al., 1998). Anaerobicamente, a oxidação citosólica de NADH pode ocorrer apenas através

da formação de glicerol, visto que a fosforilação oxidativa não é funcional sob esta condição. Dois genes, GPD1 e GPD2, ambos codificam a glicerol-3-fosfato desidrogenase, que regenera  $\text{NAD}^+$  a partir do NADH ao converter dihidroxiacetona-fosfato a glicerol-3-fosfato. Porém, a isoenzima codificada pelo gene GPD2 foi demonstrada como sendo a mais importante sob condições anaeróbicas (ERIKSSON et al., 1995). A conversão global de glicose para o etanol é redox neutro, uma vez que NADH é formado a partir da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e uma vez que a conversão de acetaldeído a etanol inclui a regeneração de NADH a  $\text{NAD}^+$  pela álcool desidrogenase I (codificada pela ADH1) (Figura 7). Assim, a formação de glicerol é importante para a manutenção do equilíbrio redox citosólico para reoxidar o NADH à medida que é formado. Uma possível estratégia para aperfeiçoar a produção de etanol pode ser reduzir a formação de glicerol pelo redirecionamento do fluxo de carbono através de manipulação do metabolismo redox (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

**Figura 7** - Descrição geral das vias bioquímicas que conduzem à formação de glicerol, piruvato e etanol.



Além disso, a biossíntese de valina e formação de diacetil é também mostrada, podendo ser contornada através da introdução de uma descarboxilase  $\alpha$ -acetolactato heteróloga que converte diretamente  $\alpha$ -acetolactato em acetoína. Abreviações: GPD1 e GPD2 - glicerol desidrogenases 1 e 2; ADH1 - álcool desidrogenase I; ILV2 - acetolactato sintase; ILV5 - acetolactato redutoisomerase. Fonte: Adaptado de OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN (2000).

Leveduras são aplicadas em grande escala na produção de etanol, onde o rendimento global obtido pela estirpe constitui o parâmetro mais importante na obtenção de um processo rentável. É importante garantir que as condições ambientais das células sejam reprodutíveis.

Isto pode ser conseguido através da utilização de técnicas avançadas como sistemas de biorreatores, onde as variáveis no cultivo são monitorizadas em linha. Com estes sistemas de biorreatores, é possível estudar a influência de um único meio componente na função celular, mantendo todos os outros fatores constantes. Ao alterar a taxa de alimentação de forma contínua para um sistema biorreator, é possível monitorar a taxa de crescimento específico sob condições de estado estacionário e agitação. Além disso, estes sistemas possibilitam estudar o comportamento celular sob condições dinâmicas muito bem controladas, por exemplo, quando as células são expostas de repente a uma concentração de glicose elevada ou através de uma mudança radical na faixa de pH, portanto, uma dinâmica alteração da taxa de crescimento específico (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

Diferentes sistemas de retenção e reciclo de células têm sido utilizados em fermentações contínuas, como por exemplo, a imobilização, filtração ou centrifugação, e são vistos como benéficos ao processo, uma vez que podem levar a adaptação dos microrganismos expostos a diferentes meios fermentativos. Se as células são recicladas, é importante que a viabilidade celular permaneça alta, e quando o fermentador é aerado durante fase inicial de fermentação, a viabilidade celular tende a aumentar (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Tem-se verificado que os sistemas de imobilização de leveduras em matriz sólida porosa oferecem numerosas vantagens em relação aos sistemas de suspensão de leveduras em termos de produção de etanol, estabilidade da atividade da levedura, armazenamento e viabilidade celular. Além disso, a possibilidade de se reutilizar o microrganismo pode melhorar substancialmente o custo do processo, proporcionando também versatilidade operacional, e ainda evitar a contaminação das estirpes puras durante a fermentação (RAZMOVSKI; VUČUROVIĆ, 2011). Uma abordagem atual levou em conta a produção de bioetanol por *S. cerevisiae* imobilizada em matriz de hidrogel (poliacrilamida) macroporosa, capacitando a atividade das leveduras por até cinco ciclos de reação com um lote único de células, que alcançaram a produção de etanol similar à conseguida utilizando-se células livres (MULKO et al., 2016).

### 3.5.5 Floculação em *Saccharomyces cerevisiae*

Para melhorar a produção em larga escala de produtos biotecnológicos é importante manter o foco na otimização da tecnologia das fermentações, o que pode conduzir a maiores rendimentos globais e produtividades. No entanto, não se deve concentrar-se apenas no

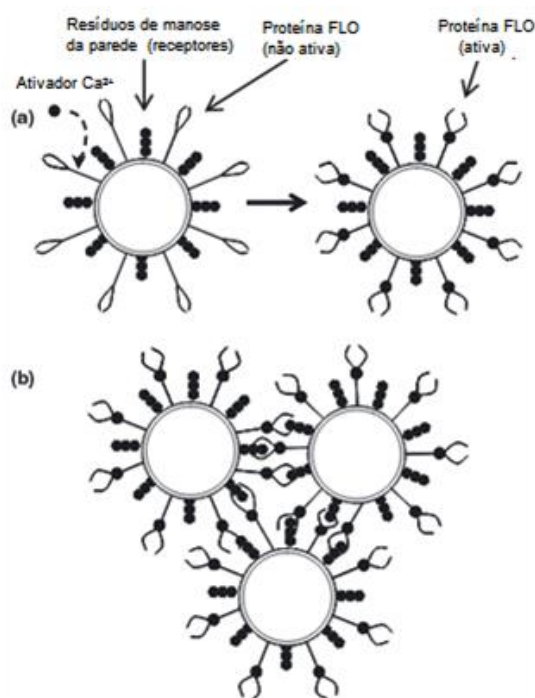
desenvolvimento de métodos adequados ou em biorreatores para melhorar certas operações unitárias de um determinado processo, mas também entender sobre a capacidade de *S. cerevisiae* em si para a melhoria do processo. Um exemplo adequado disto é a capacidade de determinadas estirpes de formar pseudomicélios e aglomerados por floculação. Uma estirpe adequada de levedura de cervejaria, por exemplo, deve ser capaz de flocular, uma vez que esta propriedade fornece o método mais rentável de compensação na produção de cerveja em comparação com outros métodos convencionais, tais como filtração e centrifugação do fermentado (SOARES, 2011). Dois mecanismos de floculação distintos foram observados: o fenótipo NewFlo, encontrado em muitas leveduras de cerveja, e o fenótipo FLO1, encontrado principalmente em cepas floculantes de laboratório, onde ambos os fenótipos diferem notavelmente em seu início de floculação. O fenótipo FLO1 exibe constitutiva floculação durante todo o crescimento, independentemente de sinais do ambiente, tais como limitação de nutrientes, enquanto floculação do tipo NewFlo parece ser desencadeada no final do crescimento exponencial quando a glicose, nitrogênio, ou limitação de oxigênio está presente (STRATFORD; ASSINDER, 1991; OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

A floculação de leveduras pode ser definida como não sexual, homotípica (envolvendo apenas um tipo de célula nas interações), reversíveis (pela ação de EDTA ou açúcares específicos, como manose) e um fenômeno multivalente de agregação de células de leveduras em massas multicelulares (composto por milhares ou mesmo milhões de células) chamados flocos, com a sedimentação rápida subsequente a partir do meio em que eles estão suspensos (SOARES, 2011).

A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* é constituída por uma camada interior, composta principalmente por  $\beta$ -glucana e quitina, e uma camada externa fibrilar constituída predominantemente por mananas altamente glicosiladas associadas a proteínas (manoproteínas) (KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006). A floculação é uma característica de superfície. A valores de pH fisiológicos, a parede celular de levedura tem carga negativa, devido à ionização dos grupos carboxila e fosfodiéster de proteínas da parede celular e fosfomananas, respectivamente. A repulsão de cargas de mesmo sinal impede as células de se aproximarem e, portanto, atua como uma barreira eficaz contra a agregação e como consequência, as células permanecem dispersas em suspensão. A redução da carga nas células deve facilitar interações célula-célula e a floculação das leveduras, além do que foi encontrada uma correlação positiva entre a hidrofobicidade de superfície celular e floculação (JIN; RITCEY; SPEERS, 2001).

Miki et al. (1982) propuseram que uma proteína semelhante à lectina específica (*lectin-like*) presente apenas em células floculantes, reconhece e interage com os resíduos de carboidratos de  $\alpha$ -mananas (receptores) de células vizinhas. Íons de cálcio permitem que as lectinas alcancem sua conformação ativa (Figura 8). Enquanto lectinas de floculação só estão presentes em células floculantes, os receptores estão presentes tanto nas células de floculação quanto nas não-floculantes, uma vez que a camada exterior da parede celular de *S. cerevisiae* é constituída por mananas. O mais provável, além das interações específicas (lectina-açúcar), são outras interações não específicas, tais como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, que devem reforçar e estabilizar as interações floculantes (SOARES, 2011).

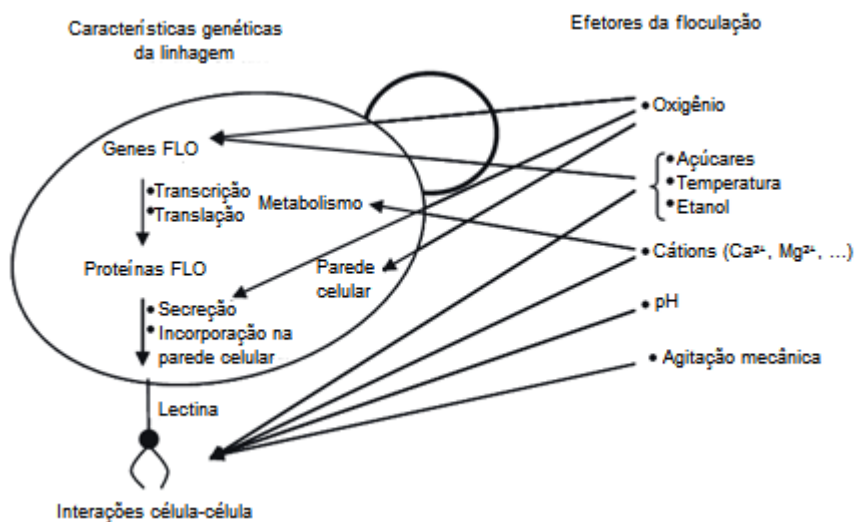
**Figura 8** - Mecanismo de floculação *lectin-like* em *Saccharomyces cerevisiae*.



(a) íons cálcio permitem que as lectinas (proteínas FLO) alcancem sua conformação ativa; (b) lectinas de floculação ativas são presentes apenas em células floculantes e interagem com os resíduos de manose (receptores) sobre as paredes celulares das células adjacentes. Fonte: Adaptado de SOARES (2011).

Além de características genéticas das cepas (genes FLO, repressores e ativadores), diferentes parâmetros podem afetar a floculação. O quebra-cabeça se torna ainda mais complexo, pois alguns destes efeitos podem atuar em mais de um nível: genes de expressão FLO, secreção de lectinas ou interação entre as lectinas de floculação e os receptores na parede celular leveduriforme (Figura 9) (SOARES, 2011).

**Figura 9** - Representação esquemática da multiplicidade de fatores que afetam a floculação de *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Adaptado de SOARES (2011).

Cátions desempenham um papel central em floculação de *S. cerevisiae*. Entre eles, o  $\text{Ca}^{2+}$  é reconhecido como o mais eficaz na promoção de floculação. Em baixas concentrações induz floculação provavelmente devido à redução das forças de repulsão eletrostáticas entre as leveduras e/ou por estimular o vazamento de mais  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Além da ação de superfície, a presença de cátions no meio de cultura ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ) como micronutrientes, parece ser essencial para expressão da floculação (STRATFORD, 1989).

O pH do meio pode ter um efeito profundo sobre a floculação das leveduras. Para várias estirpes laboratoriais e industriais, a floculação ocorre ao longo de uma larga gama de pH (2,5-9,0), onde o valor de pH ótimo ocorre entre 3,0 e 5,0. Provavelmente, a modificação do valor do pH altera a ionização dos aminoácidos (lectinas) da floculação com a consequente alteração da sua conformação (JIN et al., 2001).

A temperatura é outro fator que pode atuar em diferentes níveis no processo de floculação de levedura (Figura 9). O abaixamento da temperatura de fermentação e de crescimento conduz a uma diminuição no metabolismo da levedura e a produção de  $\text{CO}_2$ . Como consequência, há uma redução da turbulência, o que favorece a sedimentação. Propõe-se que, durante as fermentações, a agitação (força de cisalhamento) causada pela produção de  $\text{CO}_2$  exerça uma grande influência sobre o número de células em suspensão (SPEERS et al., 2006). A temperatura pode também afetar a floculação agindo sobre as interações célula-célula. Um aumento de temperatura a 50-60 °C durante alguns minutos promove a dispersão reversível dos flocos muito provavelmente devido à desnaturação das lectinas. A incubação



das estirpes a temperaturas ótimas (35-37°C) pode propiciar a floculação nas fases iniciais do crescimento exponencial (CLARO; RIJSBRACK; SOARES, 2007).

A aeração moderada é benéfica para a floculação de leveduras, enquanto a aeração forte ou condições anaeróbicas provocam a perda de floculação. Estas observações estão de acordo com o fato de manoproteínas de parede celular ser expressas de forma diferente sob condições aeróbicas ou anaeróbicas e pode ser associado a modificações na expressão dos genes que codificam lectinas de floculação (GIBSON et al., 2007).

Açúcares podem afetar a floculação atuando sobre as interações célula-célula a nível de superfície e sobre a regulação dos genes FLO (Figura 9). No primeiro caso, os açúcares promovem a dispersão reversível de flocos, uma vez que competem com os receptores de floculação (os açúcares da parede celular de levedura) para as lectinas floculantes. Além disso, açúcares fermentescíveis, incluindo aqueles encontrados em mosto, induzem a perda de floculação na fase inicial de crescimento (SOARES et al., 2004) por afetar a expressão de genes FLO.

O etanol parece ter um efeito positivo sobre a floculação de leveduras. No entanto, o mecanismo através do qual ele exerce influência positiva permanece obscuro. De acordo com uma das possibilidades, a adsorção de etanol na superfície da levedura provoca uma redução da constante dielétrica local e origina uma diminuição de repulsão eletrostática célula-célula (CLARO; RIJSBRACK; SOARES, 2007). Além da ação de superfície, o etanol parece agir sobre a expressão de genes FLO. Células floculantes quando incubadas em etanol (4% v/v), como única fonte de carbono, não perdem mais a capacidade de floculação (SOARES; VROMAN, 2003; SOARES et al., 2004).

Pouca ou nenhuma floculação ocorre em concentrações celulares abaixo de um limiar mínimo de concentração, pois a presença de um baixo número de células por mililitro limita a possibilidade física de estabelecer uma ligação de floculação, e a taxa de agregação é praticamente zero (SOARES; MOTA, 1997). Adicionalmente, um limite mínimo de agitação é necessário para que ocorra floculação. A agitação mecânica permite aumentar a energia cinética para superar a repulsão mútua entre as células; em consequência, há maior contato entre as células e formação de ligação de floculação (SOARES, 2011).

Leveduras floculantes parecem ser bem adaptadas para a produção de produtos em larga escala, como combustíveis renováveis. A indústria de bioetanol utiliza um processo descontínuo, em particular em plantas com pequena capacidade de produção e as células são geralmente removidas por centrifugação. A imobilização de células de levedura por

aprisionamento em gel não parece ser muito atraente (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008). Por outro lado, a utilização de células floculantes, tal como um processo de “auto-imobilização” é uma alternativa promissora, uma vez que reduz as despesas associadas com os custos de capital para centrifugação, consumo de energia e manutenção, o que torna o processo mais competitivo (ZHAO; BAI, 2009). O problema da separação de biomassa celular é basicamente associado ao seu pequeno tamanho e densidade. De fato, a densidade das células leveduriformes é apenas ligeiramente superior à dos líquidos de reação em que estão suspensas. Estima-se que o uso de células de *S. cerevisiae* floculantes permite uma economia de 16% nos custos de processamento e de 10% nos custos de instalação (ANDRIETTA, S.; STECKELBERG; ANDRIETTA, M., 2008). Além de facilitar o processo de separação de células do caldo, as floculantes podem ser utilizadas em reatores de alta densidade, o que melhora a produtividade de etanol e reduz o tempo de fermentação. Em escala laboratorial, várias configurações de biorreatores que utilizam células floculantes têm sido desenvolvidas para a produção de etanol continuamente. Em 2005, a operação de uma usina de etanol combustível que utiliza células floculantes com capacidade anual de produção de 20 mil toneladas foi iniciada, onde a planta consiste em seis biorreatores dispostos em modo de cascata (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008). Dois outros trabalhos descreveram a produção de etanol de modo descontínuo utilizando uma estirpe de levedura floculenta. Este processo parece ser muito promissor devido à simplicidade de configuração do processo, a reciclagem fácil das células e estabilidade no funcionamento. Numa delas, o etanol foi obtido a partir do meio de mandioca liquefeito usando fermentações repetidas (CHOI; KANG; MOON, 2009), onde o processo permitiu um aumento na produtividade de etanol com uma simples modificação da estirpe usual. No segundo trabalho, o etanol foi produzido em condições de gravidade elevada (LI et al., 2009). O uso de uma estirpe com fenótipo NewFlo parece ser adequado para a sucessiva fermentação etanólica. As cepas são não-floculentas durante a fase inicial de fermentação (evitando limitações de difusão entre os flocos) e desenvolvem a floculação mais no fim da fermentação. Num estado floculado, as células são rapidamente separadas a partir do caldo fermentado e, simultaneamente, a floculação pode proporcionar proteção contra o stress ao etanol, impedindo-as de perder a viabilidade (WESTMAN et al., 2014).

A capacidade das células de levedura para formar flocos facilita o processamento. Como uma forma natural de auto-imobilização, a utilização de estirpes floculantes abre a possibilidade de explorar diferentes configurações de fermentação e de novos modelos

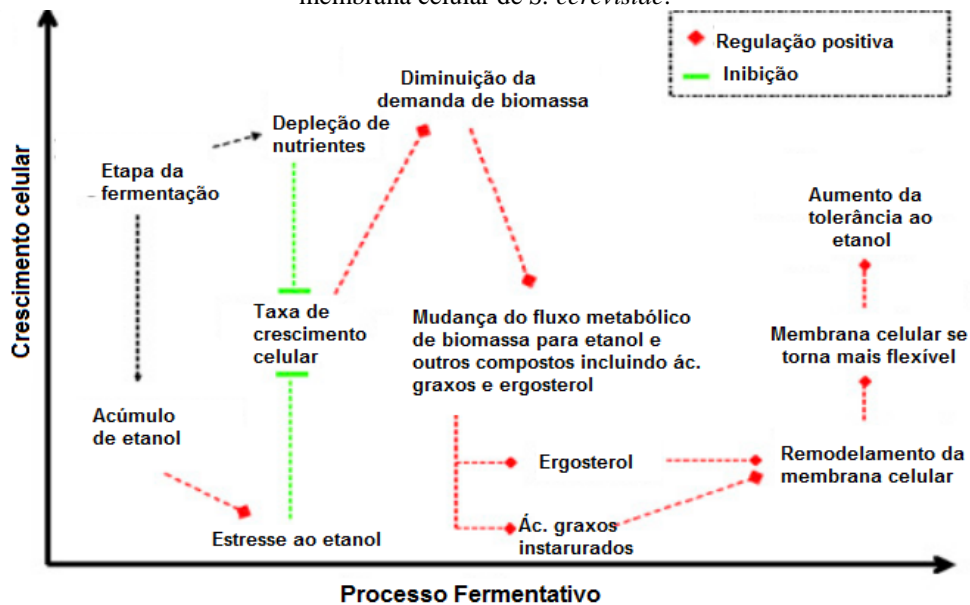
fermentativos. No entanto, essas potencialidades úteis permanecem largamente inexploradas. O uso da engenharia genética cria a possibilidade de obtenção de estirpes nas quais a expressão de floculação pode ocorrer sob condições controladas, colocando os genes FLO sob o controle de um promotor adequado (GOVENDER; BESTER; BAUER, 2010). Hoje em dia, no entanto, o uso e/ou liberação de leveduras geneticamente modificadas pela indústria exige várias garantias que estão sob muitas leis e diretrizes complexas. Além disso, a percepção pública negativa de leveduras geneticamente modificadas prejudica fortemente a sua utilização. Assim, a aplicação potencial destas estirpes parece, no presente, limitada (SOARES, 2011). Cepas floculantes de leveduras possuem desempenho bom em meios inibitórios, porém a tolerância a inibidores nunca foi claramente ligada à capacidade de floculação. Em estudo realizado por Westman et al. (2014), variantes do gene Flo1 foram transformados em outros mutantes não floculentos. Os pesquisadores observaram que as cepas que apresentaram floculação densa eram menos inibidas por furfural e mostraram perfil de consumo de glicose semelhante à estirpe selvagem.

### *3.5.6 Mecanismos de tolerância ao etanol*

Durante o processo de fermentação industrial do bioetanol, tal subproduto do metabolismo celular pode se acumular, afetando a viabilidade das células (MA et al., 2013). A membrana celular de *S. cerevisiae* é o primeiro alvo agressor do etanol, que pode influenciar na integridade e função da membrana, diminuindo desse modo a viabilidade celular. Por outro lado, a membrana celular da levedura também pode funcionar como o grande compartimento neutralizador do stress gerado pelo etanol, pois tanto a membrana como sua composição (ácidos graxos e ergosterol) desempenham papéis centrais na tolerância ao etanol. A levedura contém quase nenhum ácido graxo poli-insaturado, e os ácidos graxos oléico (insaturado) e palmítico (saturado) são predominantes, e alterações drásticas na estrutura da membrana pode ser desfavorável para a viabilidade celular (DING et al., 2009; STANLEY et al., 2010). O aumento de ergosterol pode ser a auto-proteção de *S. cerevisiae* para evitar alterações significativas na membrana plasmática, em certa medida, podendo antagonizar o aumento da fluidez da membrana gerado pelo aumento do teor de ácido oléico e mantendo a integridade estrutural, tanto quanto possível à medida que o tempo de fermentação perdura. No entanto, as mudanças exatas e funções de componentes da membrana celular da levedura durante a fermentação ainda permanece pouco compreendidas (MA et al., 2013).

Uma abordagem recente realizada por Dong et al. (2015) teve como objetivo esclarecer as funções e mudanças em componentes estruturais de membrana de *Saccharomyces* durante a fermentação. Tais pesquisadores concluíram que tanto o diâmetro de célula e a integridade da membrana diminuem à medida que o tempo de fermentação procede. Além disso, em comparação com as células em fase de latência, as células em fase exponencial e estacionária contêm maiores teores de ergosterol e ácido oléico (C<sub>18:1</sub>), e níveis mais baixos de ácido hexadecanóico (C<sub>16:0</sub>) e palmítico (C<sub>16:1</sub>), e o conteúdo de fosfolípidos apresenta aumento durante o processo de fermentação. Esse aumento no conteúdo de ácido oléico e dos fosfolípidos que contêm ácidos graxos insaturados indica uma melhoria na fluidez da membrana celular (Figura 10). Tais resultados evidenciaram que durante o processo fermentativo, células de levedura remodelam a membrana celular contribuindo para a aquisição de tolerância ao etanol em níveis mais elevados, o que pode fornecer uma melhor compreensão do processo de fermentação e futuramente na construção de cepas etanologênicas industriais com tolerância superior ao etanol.

**Figura 10** - Visão geral do efeito do processo de fermentação na tolerância ao etanol e da remodelação da membrana celular de *S. cerevisiae*.



Fonte: Adaptado de DONG et al. (2015).

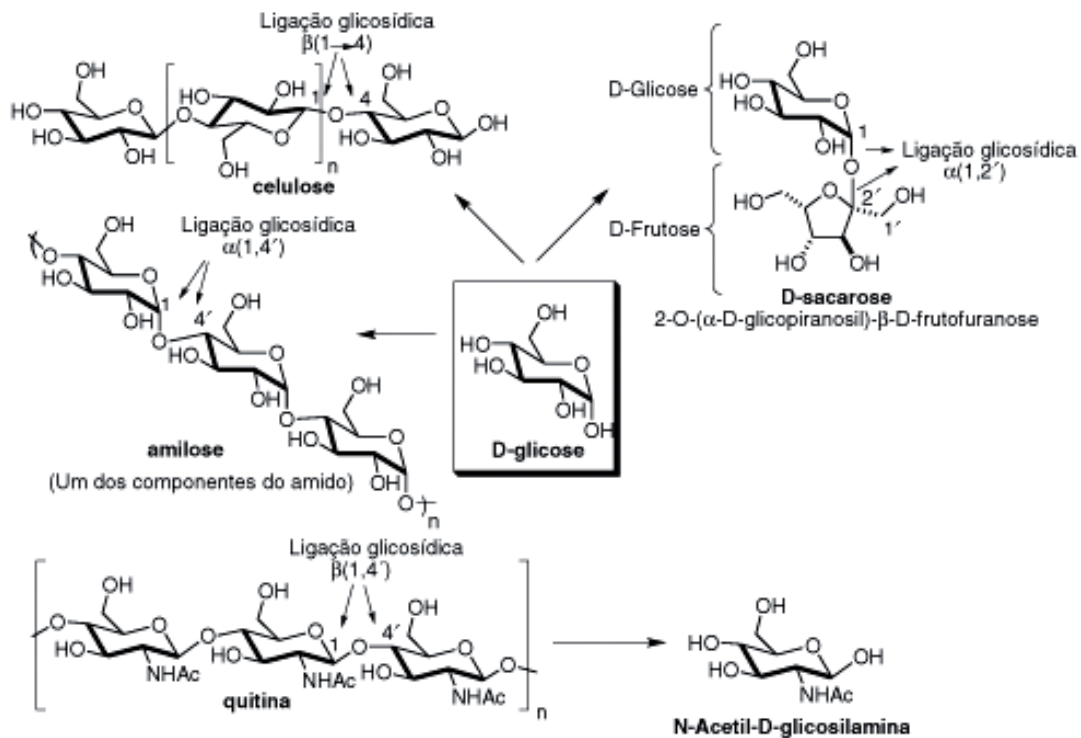
Durante a fermentação alcoólica industrial, o aumento da concentração de etanol reduz a velocidade específica de crescimento, a velocidade específica de produção de etanol e a viabilidade celular. Altas concentrações de etanol, acima de 10% (v/v), constituem fator limitante nas fermentações industriais por *S. cerevisiae*, diminuindo a produção de CO<sub>2</sub>, mesmo em meio rico em glicose (DONG et al., 2015).

### 3.6 Matérias-primas para a produção de biocombustíveis

Qualquer produto que contenha uma considerável quantidade de carboidratos constitui-se em matéria-prima para obtenção de álcool. Entretanto, para que seja viável economicamente, é preciso levar em conta o seu volume de produção, rendimento industrial e o custo de fabricação, que envolve também os custos de cultivo, transporte e processamento, além de outros aspectos não econômicos a serem considerados (MACHADO; ABREU, 2006). Os materiais lignocelulósicos constituem-se em matéria-prima para a produção de etanol, bem como de outros produtos utilizados em diversos segmentos industriais, devido ao seu caráter renovável, abundante e de seu baixo custo (BINOD et al., 2010; YAMASHITA et al., 2008; DEMIRBAS, 2003).

Devido à grande disponibilidade de resíduos agrícolas foi estimado que 491 bilhões de litros deste biocombustível pudessem ser gerados a partir de biomassa lignocelulósica residual, ampliando em até 16 vezes a sua produção anual (BINOD et al., 2010; SARKAR et al., 2012). Só nos Estados Unidos, a biomassa residual gerada é estimada em torno de 1,4 bilhões de toneladas de matéria seca por ano, sendo 30% originadas de florestas. Contudo, para que os sistemas sejam economicamente viáveis e sustentáveis, há a necessidade de utilização eficiente de todas as frações das matérias-primas, especialmente da celulose e hemicelulose. Neste contexto, tais biomassas podem suprir em grande escala a produção deste combustível, utilizando diferentes resíduos agro-industriais (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007; HU et al., 2008; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). A biomassa renovável terrestre é constituída de uma variedade de produtos de baixas e altas massas moleculares como, por exemplo, carboidratos, aminoácidos, lipídeos, e biopolímeros, como celulose, hemicelulose, quitina, amido, lignina e proteínas (Figura 11). Estas biomassas são utilizadas na alimentação e para a produção de uma variedade de combustíveis, produtos químicos e produtos energéticos (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009).

**Figura 11** - Principais biomassa renováveis baseadas em carboidratos.



Fonte: FERREIRA; ROCHA; SILVA (2009).

Os resíduos derivados de materiais lignocelulósicos mais promissores para serem empregados em bioprocessos são o bagaço de cana, palha de arroz, de milho e de trigo, provenientes da América do Sul, Ásia, Estados Unidos e Europa, respectivamente (KADAM; MCMILLAN, 2003; CHENG et al., 2008). Segundo Sarkar et al. (2012), a Ásia gera cerca de 667,6 milhões de toneladas de palha de arroz e 145,2 milhões de toneladas de palha de trigo, enquanto que a América produz 140,86 milhões de toneladas de palha de milho. Embora alguns destes resíduos sejam utilizados como ração animal, combustíveis domésticos ou mesmo para cogeração de energia, grande parte ainda é inutilizada, constituindo-se em excedentes. Adicionalmente, muitos países da Europa Ocidental proíbem a queima no campo, menos de 1% de palha de milho é recolhida para o processamento industrial, bem como cerca de 5% é utilizada como alimento e forragem para animais. Como fator agravante, nos Estados Unidos mais de 90% de palha de milho é deixada nos campos (BANERJEE et al., 2010).

De modo complementar, a indústria de celulose também gera resíduos industriais, contendo alto teor de fibras de celulose (cerca de 80%) com potencial suficiente para se tornar também matéria-prima. Isto se deve, principalmente, à presença destes materiais em abundância e a não necessidade das etapas de pré-tratamento para muitos deles, uma vez que no processo é realizada a deslignificação das polpas, que permite a remoção de grande parte da lignina para obtenção da celulose (KANG; WANG; LEE, 2010). Neste contexto, segundo

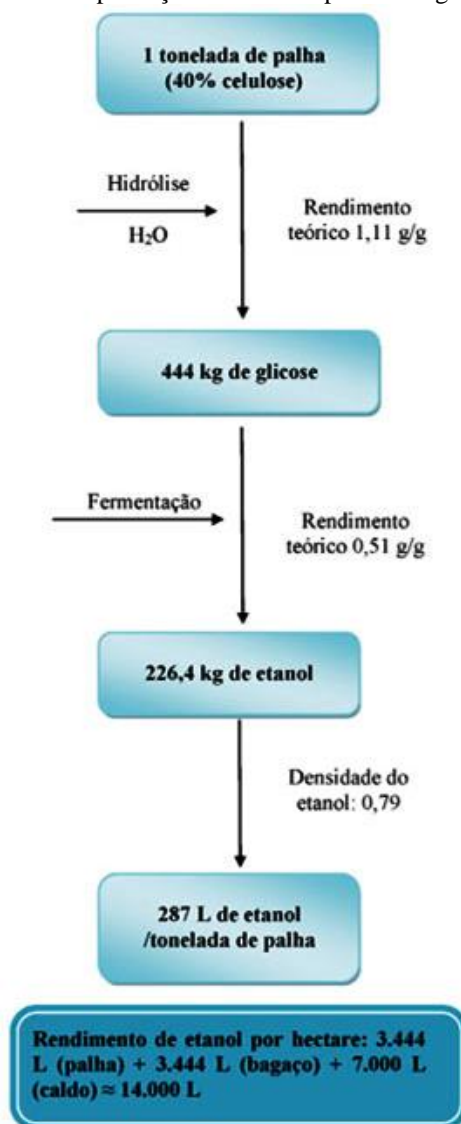
a associação brasileira de celulose e papel, nos últimos 10 anos, a produção mundial de papel cresceu 35%, sendo que o Brasil somou 8,2 milhões de toneladas de papel em 2004 e ocupou a posição de sétimo maior fabricante mundial de celulose, com cerca de 9,4 milhões de toneladas (BRACELPA, 2016).

### *3.6.1 Materiais lignocelulósicos*

Os materiais lignocelulósicos se constituem em fontes ricas de compostos orgânicos, apresentando potencial elevado como matéria-prima em processos industriais para produção de combustíveis, alimentos, enzimas, insumos químicos e diversos bens de consumo (LATIF; RAJOKA, 2001). A maioria dos resíduos agrícolas e rejeitos apresentam materiais lignocelulósicos, abundantes na natureza e com potencial renovável. A biomassa lignocelulósica se constitui em média de 40 a 60% de celulose, 20 a 40% de hemicelulose e 15 a 25% de lignina, o que pode variar conforme a matriz vegetal (SOUZA et al., 2012).

Há um grande esforço da comunidade científica no desenvolvimento de novos processos economicamente viáveis para o aproveitamento da substância lignocelulósica da biomassa, como os resíduos agrícolas (palha e bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo, resíduos de milho e resíduos florestais, como pó e restos de madeira) inclusive os resíduos de mandioca. De acordo com Santos et al. (2012), a produtividade média de cana-de-açúcar no Brasil é de 85 t/ha, onde são gerados por volta de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço em base seca a cada tonelada de cana processada, ou seja, um saldo de 12t de palha e 12t de bagaço. Tais pesquisadores estimaram que o aproveitamento da palha e bagaço da referida matéria-prima poderia dobrar a produção de etanol, passando dos atuais 7.000 litros (convencionais gerados a partir do caldo da cana) para aproximadamente 14.000 litros, sem necessidade de expansão da área cultivada, o que mostra de fato a importância em se utilizar materiais lignocelulósicos (abundantes e renováveis) para evitar excedentes e gerar valor agregado aos subprodutos, além do que no caso da cana-de-açúcar em particular, queimadas no campo se encontram cada vez mais restritas e limitadas (Figura 12) (SANTOS et al., 2012).

**Figura 12** - Rendimento teórico da produção de etanol a partir da lignocelulose de cana-de-açúcar.



Fonte: SANTOS et al. (2012).

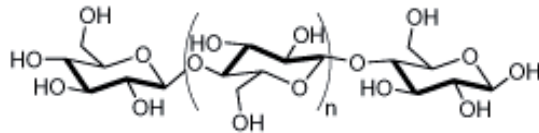
A biomassa lignocelulósica é considerada o mais abundante recurso biológico renovável da Terra, pois existe grande disponibilidade de folhas, palhas, resíduos de exploração de madeiras, rejeitos agrícolas, entre outros. É essa grande quantidade de material disponível que tem gerado o interesse para seu uso como matéria-prima na produção de etanol de segunda geração (SHARMA et al., 2007). A tecnologia de conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis para a produção de etanol vem sendo colocada como promissora para atender a demanda mundial por combustível (LIN; TANAKA, 2006). Ainda que existam tecnologias disponíveis para o processamento de celulose, muitas esbarram em dificuldades técnicas ou econômicas. Neste sentido, um dos principais gargalos que envolvem a produção de etanol celulósico consiste em desestruturar a



parede celular vegetal liberando os polissacarídeos de forma eficiente e economicamente viável, uma vez que a celulose apresenta estrutura bastante recalcitrante devido à sua forte interação intermolecular e completa ausência de água na estrutura das microfibrilas. A estrutura da lignose é constituída de fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses de lignina, onde esta última age como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas, o que torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (SANTOS et al., 2012).

O componente principal da biomassa é a celulose, considerado o polímero mais abundante do planeta e sua constituição é definida por uma cadeia linear de moléculas de glicose ligadas entre si na posição  $\beta(1\rightarrow4)$  (Figura 13) (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009).

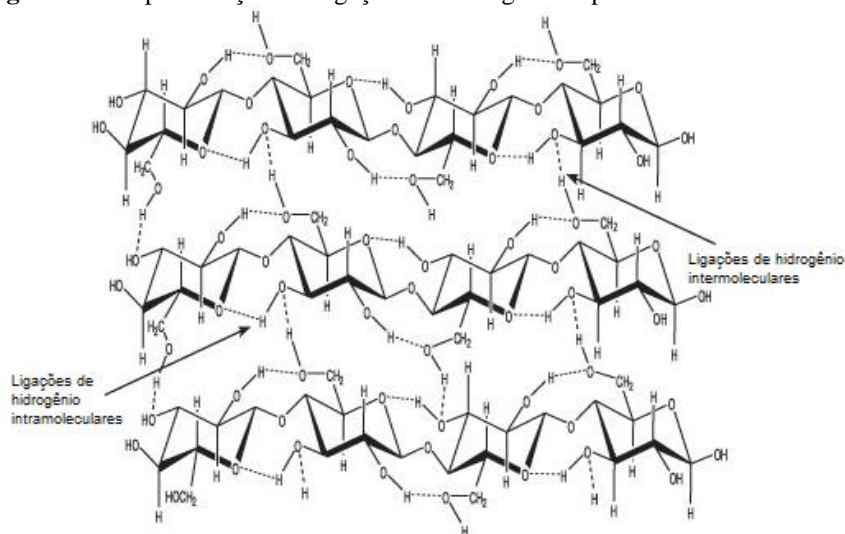
**Figura 13** - Representação esquemática da molécula de celulose.



Fonte: FERREIRA; ROCHA; SILVA (2009).

Este componente apresenta estrutura molecular onde as unidades de glicose se encontram dispostas repetidamente, e além das próprias ligações glicosídicas, formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, conforme demonstrado na Figura 14 (SANTOS et al., 2012).

**Figura 14** - Representação das ligações de hidrogênio supramolecular da celulose.

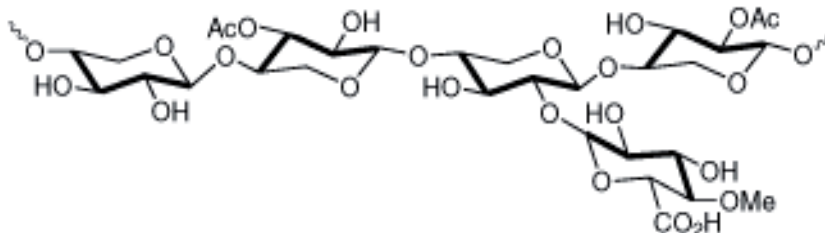


Fonte: SANTOS et al. (2012).

A celulose é encontrada em plantas sob a forma de microfibrilas de 2 a 20 nm de diâmetro e entre 100 a 40.000 nm de comprimento, e entre 2.000-25.000 resíduos de glicose. A associação das moléculas forma agregados com zonas de estrutura cristalina, conferindo elevada resistência à tensão mecânica, tornando a região cristalina da celulose insolúvel em água e em um grande número de outros solventes (DING; HIMMEL, 2006). Apesar da natureza higroscópica das moléculas individuais de glicose, a absorção de moléculas de água só é possível nas zonas amorfas devido à falta de espaços vazios na estrutura cristalina da celulose (SANTOS et al., 2012). A organização cristalina da celulose influencia a sua reatividade ao controlar o acesso de substâncias químicas ou enzimas aos grupos funcionais e às ligações químicas nas regiões cristalinas. As hidroxilas são os grupos mais abundantes na celulose, seguidos pelas ligações acetal que formam o anel das piranoses (FESTUCCI-BUSELLI; OTONI; JOSHI, 2007).

O segundo componente que se apresenta em maior quantidade na parede celular é a hemicelulose, um heteropolissacarídeo complexo composto por *D*-glucose, *D*-galactose, *D*-manose, *D*-xilose, *L*-arabinose, ácido *D*-glucurônico e ácido 4-*O*-metil-glucurônico, mas principalmente *D*-xilose. Sua função é proteger as fibras de celulose por formar ligações de hidrogênio constituindo um complexo com as microfibras de celulose e oferecendo elasticidade para impedir que estas microfibras se toquem (Figura 15). As hemiceluloses podem apresentar estruturas variadas e diferentes composições dependendo da fonte natural (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009). São estruturalmente mais semelhantes à celulose do que à lignina e sua estrutura está disposta em ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003). Comparadas com a celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem maior acessibilidade aos ácidos minerais utilizados como catalisadores. Tal reatividade é usualmente atribuída ao caráter amorfo destes polissacarídeos (SUN, et al., 2004).

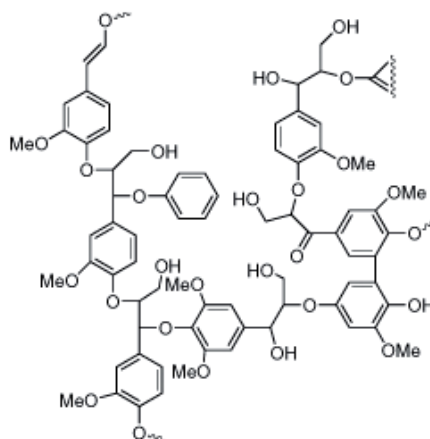
**Figura 15** - Representação esquemática da hemicelulose.



Fonte: FERREIRA; ROCHA; SILVA (2009).

A lignina é um heteropolímero estabelecido por três unidades diferentes de fenilpropanos, que são o álcool *p*-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico. A proporção destes monômeros varia entre as espécies e esta razão é usada para fins taxonômicos. Dependendo do grau de metoxilação, o grupo aromático é *p*-hidroxibenzil (derivado de álcool *p*-cumaril), guaiacil (derivado do álcool coferílico) ou siringil (derivado do álcool sinapílico). O primeiro não é metoxilado, ao passo que os dois últimos têm um ou dois grupos metoxila adjacentes ao grupo hidroxila fenólico, respectivamente. A propriedade física mais importante desta macromolécula biológica é a sua rigidez, o que não só dá força ao tecido da planta, mas também impede o colapso dos elementos de condução da água (RAMOS, 2003). A estrutura da lignina não é homogênea, possuindo regiões amorfas e estruturas globulares. Durante o processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a lignina atua como uma barreira física para que as enzimas sejam irreversivelmente adsorvidas e, como consequência, influenciará na quantidade de enzima que a hidrólise requer, assim como dificultar na recuperação enzimática após a hidrólise (Figura 15) (SANTOS et al., 2012).

**Figura 16** - Representação esquemática da lignina.

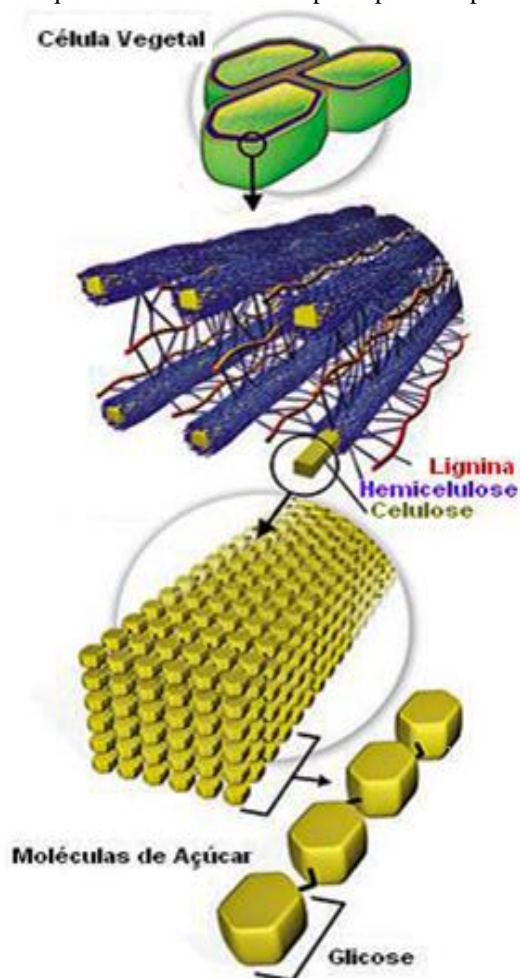


Fonte: SANTOS et al. (2012).

Sucintamente, toda célula vegetal contém parede celular composta por celulose, hemicelulose e lignina, em proporções variáveis. As ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas conferem resistência à celulose, ao passo que as interações intermoleculares entre hidroxilas são responsáveis pela estabilização das microfibrilas vegetais, tornando-as extremamente longas e resistentes. A formação de ligações de hidrogênio tem caráter somatório e é o principal fator de influência nas propriedades físicas da celulose, como solubilidade, reatividade e cristalinidade. Ademais, encontram-se aderidas

na superfície das microfibrilas as hemiceluloses, formando o domínio celulose-hemicelulose da parede celular. Por fim, a lignina auxilia no rearranjo espacial, conferindo maior rigidez e tornando o domínio altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática, dificultando o acesso de reagentes e catalizadores, sendo necessário um tratamento prévio para a remoção deste componente (ZHANG, 2008). Devido à íntima associação existente entre os três componentes poliméricos da biomassa (Figura 16), uma das mais importantes e urgentes prioridades nas áreas de pesquisa e desenvolvimento do etanol celulósico está centrada na liberação dos polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis (WEBER et al., 2010), onde muitos processos têm sido desenvolvidos no intuito de convertê-los, assim como na busca por melhores rendimentos e menores custos de processamento (SANTOS et al., 2012).

**Figura 17** - Ilustração esquemática mostrando os principais componentes da lignocelulose.



Fonte: Adaptado de SANTOS et al. (2012).

### 3.6.2 Mandioca e seus resíduos

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), também conhecida por aipim e macaxeira, é uma planta originária da América do Sul, onde sua cultura foi levada para os países africanos e asiáticos e atualmente é produzida em mais de 80 países do mundo. Este tubérculo desempenha elevada importância social e econômica, constituindo-se em fonte de renda e de energia para mais de 700 milhões de pessoas, principalmente para aquelas de baixa renda que vivem em países subdesenvolvidos, e além de apresentar custos de produção relativamente baixos em relação às outras culturas agrícolas, é uma cultura com poucos riscos e baixos investimentos (HOPPE; SHIKIDA; SILVA, 2009). A mandioca é uma planta perene que inicia o armazenamento de amido nas raízes aos 40-60 dias após o plantio e continua durante todo o período em que estiver sendo cultivada e houver condições ambientais para a ocorrência da fotossíntese. Com a finalidade de otimizar o custo/benefício, as culturas destinadas à indústria de farinha e amido geralmente são colhidas em 2 ciclos (18-24 meses), no entanto, não há impedimento técnico para que sejam colhidas antes ou após esse período (EMBRAPA, 2016). Surpreendentemente, esta espécie possui baixas necessidades de adubação nitrogenada, enquanto a cana-de-açúcar é bastante responsiva a este fertilizante. A parte aérea da planta é rica em minerais, sendo uma excelente recicladora de nutrientes do solo. Portanto, o perfil de ciclagem de nutrientes favorece a produção de mandioca em manejos autossustentáveis de produção e o balanço energético, por isso, em condições estressantes a mandioca apresenta vantagens pela tolerância a fatores bióticos e abióticos em comparação às demais culturas (ADETUNJI et al., 2016). O cultivo de mandioca não apresenta restrições quanto às condições de solo e clima, como mencionado, podendo ser cultivada em todas as regiões do país, se constituindo como um arbusto perene formado por sistema radicular subterrâneo espessado (raízes tuberosas) muito resistente à seca, o qual acumula grande quantidade de amido (FRANCO et al., 2001; VILHALVA et al., 2012).

Segundo a FAO (2016), a produção mundial de mandioca atingiu aproximadamente 275 milhões de toneladas no ano de 2013. Evidentemente, a liderança absoluta se encontrou no continente africano, que alcançou no referido ano um volume de 157,7 milhões de toneladas, registrando participação de 57,4% da produção mundial. Neste continente, a mandioca já representa a principal fonte alimentícia *in natura* para cerca de 60% da população, sobretudo as pessoas de menor renda. Dentre os principais países produtores, vale

destacar a Nigéria que se consagrou no maior produtor mundial de mandioca, passando de 10 milhões de toneladas na década de 70 para 53 milhões de toneladas em 2013, visando suprir as necessidades alimentares e reduzir a fome que ainda afeta as populações locais. Com a produção de 30,2 milhões de toneladas, a Tailândia ocupou o segundo lugar no *ranking* mundial, liderando na produção de fécula, como também nas exportações de derivados de mandioca, como *pellets* para ração animal. O Brasil, mesmo com a menor produção dos últimos anos (21,5 milhões/t em 2013), representou 75% da produção da América do Sul (Tabela 5). As maiores oscilações na produção brasileira de mandioca ocorrem por conta da redução no consumo animal, variações climáticas e os baixos preços do tubérculo, que as vezes acaba sendo pouco atrativo para os produtores (EMBRAPA, 2016).

**Tabela 5.** Produção mundial de mandioca de acordo com o continente e países selecionados como principais produtores (milhões de toneladas).

| Local                 | 1970        | 2010         | 2011         | 2012         | 2013         | Part% 2013 |
|-----------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|
| <b>África</b>         | 40,5        | 134,4        | 141,2        | 146,4        | 157,7        | 57,4       |
| Nigéria               | 10,2        | 42,5         | 46,2         | 51,0         | 53,0         | 19,3       |
| Congo                 | 10,3        | 15,0         | 15,0         | 12,0         | 12,5         | 4,6        |
| Gana                  | 1,5         | 13,5         | 14,2         | 14,5         | 16,0         | 5,8        |
| Outros                | 18,5        | 63,4         | 65,8         | 68,9         | 76,2         | 27,7       |
| <b>Ásia</b>           | 23,1        | 75,0         | 80,5         | 89,0         | 88,3         | 32,1       |
| Tailândia             | 3,2         | 22,0         | 21,9         | 29,8         | 30,2         | 11,0       |
| Indonésia             | 10,7        | 24,0         | 24,1         | 24,2         | 23,9         | 8,7        |
| Outros                | 9,2         | 29,0         | 34,5         | 35,0         | 34,2         | 12,4       |
| <b>América do sul</b> | 35,5        | 31,9         | 31,8         | 28,9         | 28,8         | 10,5       |
| Brasil                | 30,0        | 25,0         | 25,4         | 23,0         | 21,5         | 7,8        |
| Outros                | 5,5         | 6,9          | 6,4          | 5,9          | 7,3          | 2,7        |
| <b>Total</b>          | <b>99,1</b> | <b>241,3</b> | <b>253,5</b> | <b>264,3</b> | <b>274,8</b> | <b>100</b> |

Fonte: Adaptado de FAO, 2016.

Na safra de 2014/2015, o Brasil produziu 24 milhões de toneladas de mandioca, com produtividade média próxima a 15 t/ha. No norte do país destacou-se o estado do Pará que há vários anos assumiu a liderança na produção brasileira de mandioca (Tabela 6), bem como representou o maior consumo *per capita* de farinha, estimado em 35 kg/ano. A região Sul além de contribuir com 24% da produção nacional de raiz, vem ampliando o seu parque industrial, em especial no setor de fecularia, com destaque para o estado do Paraná, principal produtor agrícola da região (SEAB, 2016).

**Tabela 6.** Principais produtores de mandioca no país entre a safra de 2014/2015.

| <b>Regiões</b>      | <b>Área<br/>(mil ha)</b> | <b>Produção<br/>(mil t)</b> | <b>Produtividade<br/>(kg/ha)</b> | <b>Part.<br/>%</b> |
|---------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------|
| <b>Nordeste</b>     | 600                      | 6.153                       | 10.255                           | 25,6               |
| Bahia               | 181                      | 2.096                       | 11.580                           | 8,7                |
| Maranhão            | 197                      | 1.787                       | 9.071                            | 7,5                |
| Ceará               | 65                       | 634                         | 9.754                            | 2,6                |
| Outros              | 157                      | 1.636                       | 10.420                           | 6,8                |
| <b>Norte</b>        | 553                      | 8.376                       | 15.147                           | 35,0               |
| Pará                | 375                      | 5.426                       | 14.523                           | 22,7               |
| Amazonas            | 84                       | 833                         | 9.917                            | 3,5                |
| Outros              | 94                       | 2.117                       | 22.521                           | 8,8                |
| <b>Sudeste</b>      | 139                      | 2.457                       | 17.676                           | 10,2               |
| São Paulo           | 60                       | 1.326                       | 22.100                           | 5,5                |
| Minas Gerais        | 59                       | 840                         | 14.237                           | 3,5                |
| Outros              | 20                       | 291                         | 14.550                           | 1,2                |
| <b>Centro-Oeste</b> | 74                       | 1.426                       | 19.270                           | 6,0                |
| Mato Grosso do Sul  | 44                       | 968                         | 22.000                           | 4,0                |
| Mato Grosso         | 21                       | 309                         | 14.714                           | 1,3                |
| Outros              | 9                        | 149                         | 16.556                           | 0,6                |
| <b>Sul</b>          | 239                      | 5.588                       | 22.346                           | 23,2               |
| Paraná              | 156                      | 4.000                       | 25.641                           | 16,5               |
| Rio Grande do Sul   | 66                       | 1.154                       | 17.485                           | 4,8                |
| Santa Catarina      | 23                       | 434                         | 18.870                           | 1,8                |
| <b>Brasil</b>       | <b>1.611</b>             | <b>24.000</b>               | <b>14.898</b>                    | <b>100,0</b>       |

Fonte: SEAB (2016).

Existe grande demanda para o aproveitamento de resíduos industriais que visam reduzir o impacto ambiental. Se o país se destaca na produção de mandioca, tanto pela obtenção de fécula quanto de farinha de mesa, o resultado é a geração de uma grande quantidade de resíduos, que em geral, são desperdiçados e quando utilizados como ração animal acontece de forma equivocada, já que os produtores os utilizam na forma *in natura* sem nenhum tipo de complemento alimentar (MICHELAN et al., 2006; FERREIRA; SILVA, 2011). É sabido que antes de serem utilizados diretamente como ração, estes resíduos são deixados ao sol; levados em fornos para secagem ou então fermentados para que seja eliminada parte do cianeto de hidrogênio que se concentra em maior proporção nas entrecasas, evitando problemas de toxicidade ao animal alimentado, além do que estes

resíduos contém alto teor de fibras, o que limita sua digestibilidade e ainda é pobre em proteínas (FERREIRA et al., 2007).

Resíduos de mandioca são normalmente armazenados em campo aberto e estragam rapidamente, não só causando problemas ambientais, incluindo contaminação de corpos d'água, mas também emanam fortes odores ofensivos (ZHANG et al., 2016). A fabricação dos derivados da mandioca gera resíduos como as cascas, entrecascas, raspas, pontas das raízes e farinha de varredura (manipueira) que podem ser aproveitados para produzir rações e outros produtos, entre eles o bioetanol, evitando assim o desperdício (CALDAS NETO et al., 2000; ELEMKE; OSEGHLE; OKOYE, 2015; ADEKUNLE; ORSAT; RAGHAVAN, 2015; NANSSOU; NONO; KAPSEU, 2016; VEIGA et al., 2016). Pandey et al. (2000) avaliaram desenvolvimentos biotecnológicos (predominantemente fermentação em estado sólido) para a utilização do bagaço de mandioca. Tomando a China como exemplo, existem atualmente mais de 30 destilarias a base de mandioca, com uma produção total de etanol de mais de 400.000 m<sup>3</sup> por ano. Em 2020, um aumento da produção de etanol à base de mandioca é esperado em um milhão/m<sup>3</sup>, e como resultado deste crescimento generalizado de indústrias a base de mandioca, grandes quantidades de resíduos serão gerados (ZHANG et al., 2016). Moshi e cols. (2015) citam que são gerados 0,47 toneladas de resíduos sólidos para cada tonelada de mandioca processada. Resíduos de mandioca são gerados no processamento da fabricação da farinha ou fécula, apresentando elevado teor de umidade, que chega a 85%. Quando desidratados ao sol, estes devem atingir 88% de matéria seca (MS) e apresentam 58,1 % de amido, 3,4 % de proteína bruta (PB) e 28,6 % de fibra em detergente neutro (FDN). Portanto, estes resíduos contém grande quantidade de amido e fibras de alta qualidade (LACERDA et al., 2009).

O descascamento da mandioca pode ser realizado mecanicamente, utilizando o lavador-descascador ou manualmente, ainda muito realizado na região do nordeste tradicionalmente. É durante esta etapa que são produzidos os resíduos sólidos (cascas, entrecascas, raspas e pontas), não devendo ficar acumulados na área de trabalho, evitando assim o aparecimento de moscas, baratas e outros insetos que possam contaminar a matéria-prima. A casca é uma camada fina de coloração marrom clara ou escura e apresenta alto teor de celulose. Já a entrecasca apresenta coloração branca e aspecto pergaminoso, e a raspa é um subproduto constituído da própria raiz picada ou triturada. A casca marrom corresponde, em termos técnicos, à periderme e varia entre 2% e 5 % do total de raiz, sendo fina e bastante celulósica. Embora geralmente castanha escura, pode ser de cor branca ou de cor creme



dependendo da variedade da mandioca. Uma pequena quantidade de polpa interna, ou parênquima cortical pode sair com a casca, causando perdas em fábricas de fécula (MORAES-DALLAQUA; CORAL, 2002). Nas indústrias farinheiras é recomendável a retirada da casca interna caso esta seja altamente fibrosa, podendo ser utilizada como fertilizante ou rações para animais (CALDAS NETO et al., 2000). Resíduos de mandioca provenientes de feculárias são altamente perecíveis, onde a secagem apresenta-se como alternativa na armazenagem segura e livre do desenvolvimento de microrganismos (VILHALVA et al., 2012). Algumas consequências resultantes da fermentação das pilhas de resíduos de mandioca incluem poluição do ar (forte odor às vezes tóxico devido ao componente cianeto presente), vegetação e solo em torno dos montes acumulados se tornam improdutivos e devastados devido a reações químicas e biológicas que ocorrem entre a contínua fermentação dos resíduos, o solo e a vegetação circundantes. Estes resíduos constituem um importante recurso potencial se devidamente aproveitados na área biotecnológica (UBALUA, 2007; TUMWESIGYE et al., 2016).

Os valores da composição química da mandioca e de seus derivados não são homogêneos e padronizados. Fatores como nível tecnológico da indústria, qualidade da mão-de-obra, metodologia de análise e as diversas cultivares podem influenciar esse aspecto químico (BURNS et al., 2012). Uma análise revelou que a casca de mandioca é rica em amido residual e também contém proporções significativas de carboidratos estruturais, bem como lignina (MOSHI et al., 2015), que pode atuar como uma barreira microbiana preventiva contra a hidrólise do material celulósico das cascas, podendo resultar em baixas produtividades energéticas. Pesquisas focadas na minimização dos desperdícios ambientais da mandioca e seus derivados com o desenvolvimento de produtos de valor foram recentemente abordadas na literatura (SOUZA et al., 2013; EZEJIOFOR; ENEBAKU; OGUEKE, 2014; RAABE et al., 2015; VERSINO; LÓPEZ; GARCÍA, 2015; TUMWESIGYE; OLIVEIRA; SOUSA-GALLAGHER, 2016). No referido estudo de Moshi et al. (2015), eles selecionaram como resíduos as cascas de mandioca para fermentação posterior, que apresentaram para o interesse aqui descrito celulose (11%), proteína bruta (8,1%), amido residual (40%), lignina (16%), e 40 ppm de cianeto de hidrogênio também foi quantificado (Tabela 7). Portanto, este resíduo é considerado como lignocelulósico, bem como representa uma verdadeira fonte de glicose que poderá ser abundantemente utilizada como fonte de carbono (hexoses) em ensaios fermentativos.

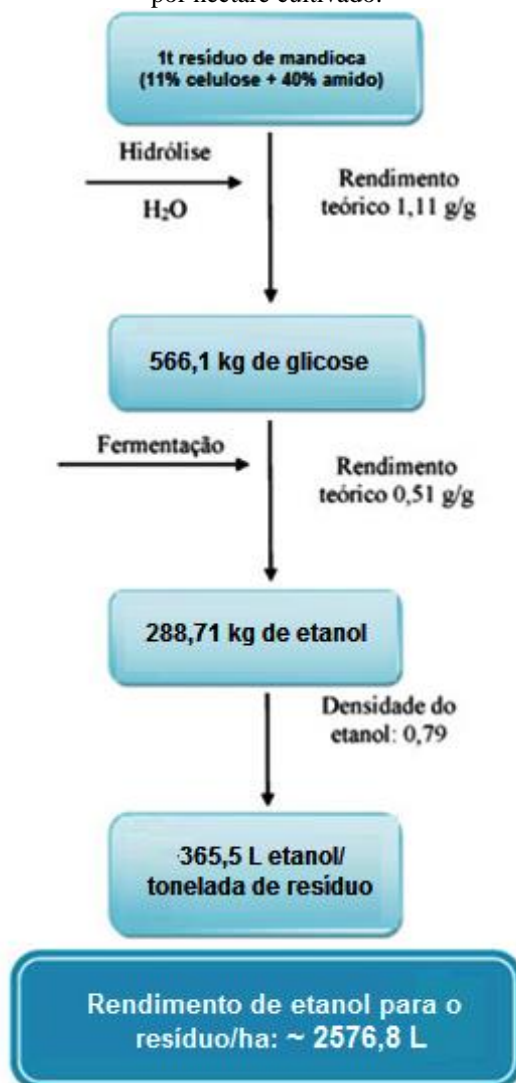
**Tabela 7.** Características físico-químicas de resíduos de mandioca de mesa.

| Características                    | Cascas de <i>Manihot esculenta</i> (MEP) |
|------------------------------------|--|
| Sólidos totais (%)                 | 89 (1.2)                                 |
| Sólidos voláteis (%)               | 85 (0.1)                                 |
| Teor de umidade (%)                | 11 (1.5)                                 |
| Grau de solubilização (%)          | 21 (0.6)                                 |
| Teor de amido (%) peso seco        | 40 (2.3)                                 |
| Celulose (%) peso seco             | 11 (0.4)                                 |
| Lignina total (%) peso seco        | 16 (0.8)                                 |
| Proteína bruta total (%) peso seco | 8.1(0.2)                                 |
| Cianeto total (ppm)                | 40 (1.2)                                 |
| Conteúdo de cinzas (%) peso seco   | 3.1 (0.2)                                |

Fonte: Adaptado de MOSHI et al. (2015).

De acordo com dados apresentados ao longo deste tópico, a produtividade média de mandioca no Brasil é de aproximadamente 15 t/ha (SEAB, 2016), sendo que para cada tonelada de mandioca processada são gerados cerca de 0,47 toneladas de resíduos (MOSHI et al., 2015). Tem-se então um total de 7,05 t/ha de resíduos sólidos provenientes do processamento de mandioca. Considerando que toda a glicose seja convertida em etanol, conforme o mesmo esquema proposto por Santos et al. (2012) já ilustrado nesta literatura anteriormente, onde avaliaram o potencial da palha de cana de açúcar para produção de etanol (encontrando valores próximos a 3.444 litros de etanol/ha), o aproveitamento integral dos resíduos da mandioca poderia levar a uma produção de cerca de 2.576 litros de etanol/ha, ou seja, 36,8% do total de etanol gerado a partir da cana-de-açúcar, atualmente em torno de 7.000l/ha (SANTOS et al., 2012). Vale salientar que a produtividade média da cana-de-açúcar no país é de 85 t/ha de acordo com o autor supracitado, muito superior à da cultura da mandioca, mostrando então que os resíduos desta raiz tuberosa apresentam potencial na produção de etanol celulósico e que as cultivares ainda carecem de aperfeiçoamento tecnológico e investimento em pesquisas para que a produtividade por hectare seja ampliada (Figura 18).

**Figura 18** - Rendimento teórico aproximado da produção de etanol celulósico a partir de resíduos de mandioca por hectare cultivado.

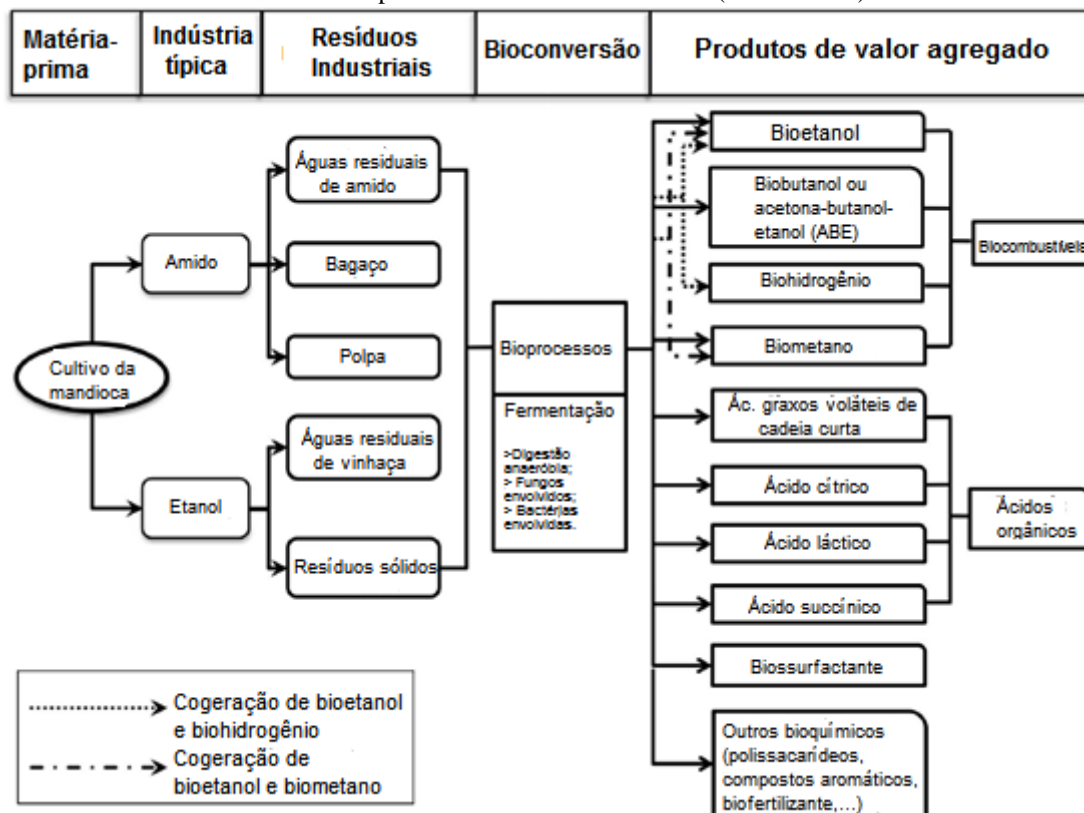


Fonte: O próprio autor.

Em 2011, um estudo realizado pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) estimou que cerca de um terço de todos os alimentos produzidos para consumo humano em todo o mundo é descartado, o que representa cerca de 1,3 bilhões de toneladas de resíduos por ano) e estes resíduos altamente putrescíveis também causam sérias preocupações ambientais, além do que são biorrecursos prontamente disponíveis e de custo relativamente baixo para a produção de vários produtos de valor agregado (GUSTAVSSON, STAGE, 2011). Os resíduos de indústrias a base de mandioca têm enorme potencial para gerar diversos produtos de maior valor pela adoção de um conceito de biorrefinaria, o que poderia reduzir a necessidade de expandir o uso da terra para culturas energéticas específicas, enquanto simultaneamente reduz potenciais questões de insegurança alimentar. Os resíduos à base de mandioca podem ser

convertidos biologicamente em vários produtos de alto valor (Figura 19) para maximizar a eficácia de utilização deste importante recurso biológico (ZHANG et al., 2016).

**Figura 19** - Diagrama esquemático de processos industriais à base de mandioca e a bioconversão de resíduos de mandioca em produtos de valor acrescentado (biorrefinaria).



Fonte: Adaptado de ZHANG et al. (2016).

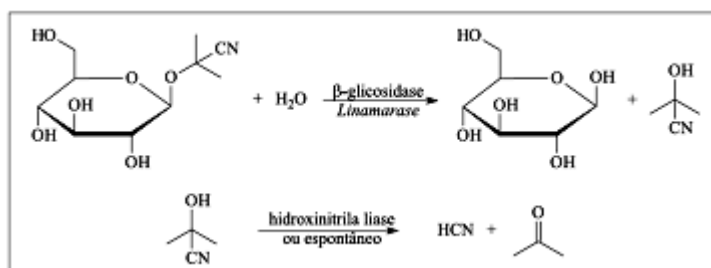
A mandioca tem sido identificada como uma matéria-prima adequada para a produção de bioetanol devido ao seu elevado teor de amido (70-85% com base em peso seco) de biomassa e elevada produção. Por exemplo, a produção de mandioca mundialmente está em torno de 30-40 t/ha que se traduz em 4800-7600 litros de bioetanol por hectare. Durante a produção de bioetanol, o custo da matéria-prima contribui com entre 50 a 70% de custo total de produção (MOSHI et al., 2015 b).

### 3.6.2.1 Glicosídeos cianogênicos presentes em *Manihot sp.*

As plantas cianogênicas contêm como princípio ativo o cianeto de hidrogênio (HCN), caracterizado como um líquido incolor, bastante volátil, considerado como uma das substâncias mais tóxicas que se tem conhecimento. Em certos organismos vegetais, este composto encontra-se ligado a carboidratos denominados de glicosídeos cianogênicos, sendo

liberado após sua hidrólise. Inúmeros glicosídeos têm sido isolados e incluem a linamarina e lotaustralina em *Manihot* sp., sendo considerados produtos secundários do metabolismo das plantas, provavelmente como um sistema de defesa contra herbívoros e insetos (AMORIM; MEDEIROS; RIET-CORREA, 2006). Os glicosídeos cianogênicos são solúveis em água, o que potencializa a liberação de HCN (CEREDA; MATOS, 1996). Quando o material vegetal é dilacerado como, por exemplo, mediante a mastigação ou descasque, o glicosídeo em presença de água (do próprio tubérculo ou advinda de lavagem) é hidrolisado enzimaticamente por  $\beta$ -glicosidases, que encontram-se em compartimentalizações separadas dos glicosídeos no tecido vegetal intacto (AMORIM; MEDEIROS; RIET-CORREA, 2006; TOKARNIA et al., 2012). As enzimas localizam-se na parede celular e os glicosídeos cianogênicos nos vacúolos. Essa situação não faz diferença para os ruminantes, uma vez que bactérias ruminais podem hidrolisar os glicosídeos cianogênicos com rapidez, liberando o HCN. A hidrólise dos glicosídeos cianogênicos produz glicose e  $\alpha$ -hidroxinitrilas (Figura 20). Esta última, quando catalisada por uma hidroxinitrila liase, transforma-se em HCN e nas acetonas correspondentes, processo chamado de cianogênese (CEREDA; MATOS, 1996).

**Figura 20** - Processo de liberação do cianeto por enzimas autóctones.



Fonte: CEREDA; MATOS (1996).

Normalmente pequenas doses de cianeto de hidrogênio são detoxificadas a tiocianato e removidas pela urina (TOKARNIA et al., 2012). O cianeto inibe diversos complexos enzimáticos e seu mecanismo primário de ação relaciona-se com a inibição enzimática da citocromo-oxidase, onde seu local de ação é o ferro da metalo-porfirina. O HCN possui grande afinidade pela forma heme-férrica da citocromo-oxidase, formando nas mitocôndrias um complexo relativamente estável (ciano-citocromo-oxidase), deixando o ferro em estado trivalente, interrompendo o transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória, inibindo, desse modo, o mecanismo oxidativo e a fosforilação. Em outras palavras, a transferência de elétrons da citocromo-oxidase para o oxigênio molecular é interrompida e a cadeia respiratória é paralisada. Como a oxihemoglobina não pode liberar o oxigênio para o

transporte de elétrons, o sangue apresenta uma coloração vermelho-brilhante (SHAMA; WASMA, 2011; RIVADENEYRA-DOMÍNGUEZ et al., 2013). Intoxicação por *Manihot esculenta* ocorre principalmente quando ruminantes ingerem tubérculos imediatamente após a colheita, quando alimentados com resíduos sem tratamento prévio após a industrialização, ou ainda quando os animais ingerem as partes aéreas da planta (folhas e caules) geralmente após a brotação. A remoção dos compostos cianogênicos presentes na mandioca para redução de sua toxicidade pode ser realizada por ralação ou trituração do material vegetal, permitindo que a ruptura das células libere as  $\beta$ -glicosidases, capazes de hidrolisar os glicosídeos cianogênicos, por aquecimento para remover os resíduos de cianeto livre (acetonacianidrina e HCN), por prensagem, onde os glicosídeos solúveis em água são arrastados, embora possa trazer sérios transtornos ambientais em razão da presença do composto em águas residuais, cozimento, a fermentação e a desidratação (SORNYOTHA; KIU; RATANAKHANOKCHAI, 2010). Dentro de muitas espécies de *Manihot* sp., as cascas podem conter mais cianeto do que a polpa do tubérculo (Tabela 8), onde o nível do total de HCN varia amplamente entre as espécies, e a morte tem sido mais comum com as variedades "amargas" que contenham níveis de HCN superior a 500 ppm (TEWE; LYAYI, 1989).

**Tabela 8.** Teor de HCN de mandioca e alguns produtos utilizados na alimentação animal.

| Mandioca/Subprodutos   | Teor de cianeto de hidrogênio (ppm) |
|--|-------------------------------------|
| Raiz inteira fresca  | 88.3–416.3                          |
| Polpa fresca   | 34.3–301.3                          |
| Casca fresca   | 364.2–814.7                         |
| Raiz inteira seca ao sol   | 23.1–41.6                           |
| Polpa seca ao sol  | 17.3–26.7                           |
| Casca seca ao sol  | 264.3–321.5                         |
| Raiz inteira seca ao forno   | 51.7–63.7                           |
| Polpa seca ao forno  | 23.7–31.3                           |
| Casca seca ao forno  | 66.8–125.0                          |
| Resíduos de mandioca seca (cascas e pequenos tubérculos descartados) | 240.0                               |

Fonte: Adaptado de TEWE; LYAYI, (1989).

Uma extensa pesquisa avaliou 1750 cultivares de mandioca (BOKANGA, 1994) e ficou constatado que no parênquima tuberoso da maioria delas se concentravam valores menores que 100 ppm de cianeto de hidrogênio, no entanto, muitas espécies apresentaram valores maiores que 50 ppm, significativamente mais elevados do que o relatado pela *Food and Agriculture Organization* e *World Health Organization* (FAO/WHO, 2003) como limite de segurança para humanos, no caso, 10 ppm/HCN. O potencial para envenenamento é ainda mais complicado pelo fato de o teor de cianeto de mandioca variar de acordo com as

condições ambientais, tais como a seca (levando a um aumento do potencial cianogênico), baixa concentração de outros nutrientes essenciais (folhas e raízes podem apresentar concentrações muito baixas dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína, importantes para a desintoxicação no caso de ingestão dos glicosídeos cianogênicos (BURNS, et al., 2012).

Oboh (2006) e Oboh e Akindahunsi (2003) verificaram em seus estudos que a concentração de cianeto em cascas de mandioca fermentadas foi relativamente baixa, em comparação ao teor de cianeto normal em polpa e cascas de mandioca não fermentadas. Iwuoha et al. (2013) também observaram que após dois dias de fermentação do tubérculo de mandioca ralado, houve uma redução de 41,7% do nível de HCN da amostra. Isto sugere que leveduras são capazes de utilizar glicosídeos cianogênicos e os produtos de degradação, o que explica porque esta é uma das floras naturais envolvidas na fermentação durante o processamento de mandioca (TWEYONGYERE; KATONGOLE, 2002). Métodos fermentativos não apenas reduzem o teor de HCN como também aumentam o teor de nutrientes, como por exemplo, de proteínas (BOONNOP et al., 2009), indicando que ela é a mais vantajosa em comparação a outros métodos como secagem convencional. A multiplicação de células de leveduras (*S. cerevisiae*) em resíduos de mandioca e em outros resíduos fornece uma explicação para o aumento do teor de proteínas de tais produtos fermentados (OBOH; AKINDAHUNSI, 2003).

Por fim, a inclusão de altas concentrações de resíduos de mandioca não processados como alimentos para animais monogástricos ou como parte da formulação de dietas é limitada devido a sua natureza fibrosa, composta de uma quantidade elevada de polissacáridos estruturais, resultando em baixa digestibilidade. Além disso, a utilização da casca também é limitada devido aos níveis de toxicidade extremamente elevados de cianeto de hidrogênio e do baixo teor em proteínas (ADEREMI; NWORGU, 2007). Portanto, a bioconversão destes resíduos em fontes de energia renováveis promove um melhor aproveitamento dos mesmos.

### **3.7 Hidrólise do material lignocelulósico**

Para se utilizar a glicose proveniente de materiais lignocelulósicos é necessário realizar a hidrólise da celulose. Existem vários processos de hidrólise sendo estudados e empregados em nível de pesquisa e escala industrial para diversas finalidades (LIMAYEM;

RICKE, 2012). Existem tratamentos químicos, físicos, físico-químicos e biológicos que podem liberar os açúcares fermentescíveis presentes nos resíduos lignocelulósicos. Dentre os tratamentos usuais estão a hidrólise ácida, hidrólise enzimática, hidrólise alcalina, a aplicação de ozônio, organossolventes e deslignificação oxidativa. As hidrólises alcalinas e ácidas podem ser utilizadas como hidrólise e pré-tratamento separadas ou em conjunto com a hidrólise enzimática (ALVIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2012). O método enzimático é o que apresenta maior potencial de desenvolvimento, porém ainda muito dispendioso. Para que a ação das enzimas seja eficiente, é necessário que elas tenham acesso às moléculas a serem hidrolisadas, daí a necessidade de tratamentos prévios. Em geral, usa-se um consórcio contendo endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidade que juntas levam a uma conversão próxima de 100%. Além do custo das enzimas, uma dificuldade nesse processo é conhecer o teor de celulose e hemicelulose de cada matéria-prima, para se estimar a quantidade de enzimas a ser adicionada para uma eficiência satisfatória. Por sua vez, esse processo apresenta vantagens como alta eficiência e pequena produção de resíduos, gastos com energia relativamente baixos e condições brandas de processamento (DYK; PLETSCHKE, 2012). No entanto, Ishola et al. (2014) verificaram que o conteúdo de celulose em pré-tratamentos biológicos da lignocelulose foi mais baixo em comparação com a matéria-prima não tratada. Isso se deve pelo fato da utilização de celulose pelo organismo como fonte de carbono para o crescimento e multiplicação, contribuindo significativamente para a redução de celulose no hidrolisado pré-tratado utilizando microrganismos secretores de enzimas que degradam a lignocelulose em processos de sacarificação e fermentação simultânea (TESFAW; ASSEFA, 2014).

A função da hidrólise é romper as ligações glicosídicas ou acetais nas frações de hemicelulose e de celulose em seus componentes mais simples (pentoses e hexoses). Após a hidrólise, os açúcares podem ser fermentados a etanol (TORGET; HSU, 1994). Entretanto, em diversos casos, um pré-tratamento se torna necessário, sendo este a solubilização e a separação de um ou mais componentes principais da biomassa (hemicelulose, celulose, lignina e extrativos) para permitir que a biomassa sólida remanescente esteja mais acessível ao tratamento biológico ou químico (ALVIRA et al., 2010; DUSSÁN et al., 2014;). Ou seja, tratar a biomassa com vapor de alta pressão, principalmente com a adição de uma quantidade pequena de um catalisador ácido, como o ácido sulfúrico ou o dióxido de enxofre se torna um método eficaz de pré-tratamento para diversos materiais lignocelulósicos. A aplicação de ultrassons, micro-ondas e calor podem contribuir também para a degradação e/ou



despolimerização do material lignocelulósico (SUN; CHENG, 2002). Existe uma diversidade de métodos disponíveis de pré-tratamento ou combinações de métodos. A função do pré-tratamento físico é quebrar o tamanho das fibras através da moagem ou processamento aquoso/vapor. O pré-tratamento físico geralmente utilizado pelos produtores de milho para a produção de etanol é a moagem, o que torna reduzido o tamanho das sementes, facilitando a hidrólise enzimática. Para materiais celulósicos os métodos requerem pré-tratamentos físicos muito mais eficientes, como por exemplo, a explosão a vapor (KUMAR et al., 2009).

Na hidrólise ácida, geralmente são utilizados ácidos sulfúrico, clorídrico ou nítrico, podendo ser concentrados ou diluídos, cujo rendimento médio em pentose e hexoses (base seca) é de 75 % a 90%, podendo ser considerado um efeito vantajoso, por apresentar menor custo. Para o processo de hidrólise alcalina são utilizadas bases, como os hidróxidos de sódio ou cálcio, apresentando um rendimento de 60 a 75%, sendo considerada também muito vantajosa para esta aplicação. Já a hidrólise por ação biológica com a utilização de fungos para solubilizar a lignina é utilizada geralmente em associação com outros processos. Os pré-tratamentos são extremamente importantes nos processos de conversão da celulose. Eles são fundamentais para a modificação da estrutura da biomassa celulósica, o que possibilita a conversão do polímero em açúcares fermentescíveis quebrando sua estrutura cristalina (LU et al., 2007).

Em pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos, a hidrólise utilizando diferentes ácidos tem sido utilizada com eficácia. Dentre estes, o ácido sulfúrico, em concentrações inferiores a 4% em peso, é o mais utilizado nos estudos, pela sua eficiência e baixo custo, e também por promover velocidades de reação superiores e melhorar de forma significativa a hidrólise da celulose. O processo de hidrólise com ácido diluído utiliza temperaturas elevadas (160-230 °C) e pressões (~10 atm), na qual a concentração ácida está em torno de 2-5%. O objetivo primordial deste pré-tratamento é a quebra da estrutura de lignina visando atingir a estrutura cristalina da celulose, de modo que os ácidos possam facilmente acessar e hidrolisar a celulose em açúcares mais simples. Pode ser o processo mais caro na conversão de biomassa em combustíveis, mas apresenta grande potencial para melhorias na eficiência e redução de custos através de pesquisas buscando o desenvolvimento de pré-tratamentos cada vez mais eficazes. Assim, a hidrólise ácida apresenta como vantagens o pequeno tempo de sacarificação, porém tem como desvantagens evidentes os problemas de corrosão dos equipamentos e a necessidade de neutralização da solução açucarada após a hidrólise, além de provocar degradação parcial dos açúcares, porém não tanto quando aplicada a hidrólise

alcalina (KUMAR et al., 2009; MENON; RAO, 2012). Lu e colaboradores (2007) realizaram pré-tratamento em palha de milho nas concentrações de ácido sulfúrico a 2%, 4% e 6% na temperatura de 80, 100, e 120 °C, e observaram que as condições ótimas para o pré-tratamento foram 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e tempo de reação de 43 min a 120 °C, o que implica que um fator significativo no tratamento de biomassa agroindustrial é a aplicação de calor seguida de adição de ácido.

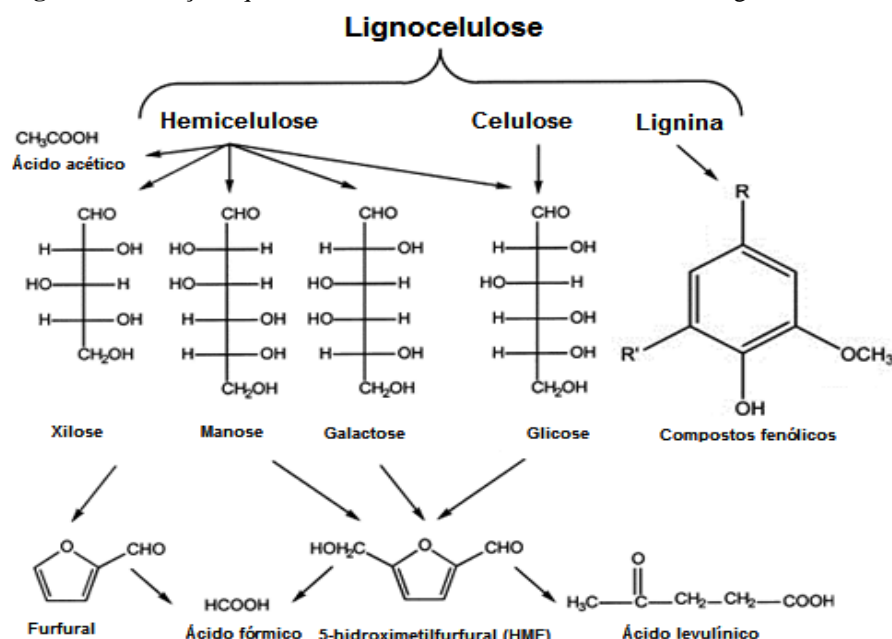
### 3.8 Compostos inibidores em hidrolisados lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos contêm açúcares polimerizados de celulose e hemicelulose que podem ser liberados por hidrólise, e subsequentemente fermentados em etanol por microorganismos, por exemplo, a *Saccharomyces cerevisiae*. Durante a hidrólise destes materiais, uma vasta gama de compostos inibidores para microorganismos são formados ou liberados, e baseados em sua origem, geralmente se dividem em três grupos principais: ácidos carboxílicos, derivados de furanos e compostos fenólicos (TAHERZADEH; KARIMI, 2011; LUDWIG et al., 2013; TESFAW, ASSEFA, 2014). Além destas três categorias, o glicolaldeído foi relatado como outro composto inibidor (JAYAKODY; HAYASHI; KITAGAKI, 2011). Tais substâncias podem limitar a utilização eficaz dos hidrolisados para a produção de etanol por fermentação, e conseqüentemente, o rendimento e a produtividade poderão ser comprometidos. No entanto, se os inibidores são identificados e os mecanismos de inibição elucidados, a fermentação pode ser melhorada através do desenvolvimento de métodos de detoxificação específicos, seja pela escolha de um microorganismo adaptado e/ou pela otimização dos processos fermentativos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A hidrólise com ácido diluído é fácil de realizar e rápida, porém, dificultada pela falta de seletividade e formação de produtos secundários. Normalmente, a hidrólise ácida é realizada usando ácidos minerais, tais como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou HCl a temperaturas entre 120°C e 200°C, aos quais rendimentos de etanol obtidos na hidrólise ácida correspondem a 50-60% dos valores teóricos (TORGET; HSU, 1994). Procedimentos de hidrólise que envolvem o tratamento de lignocelulose a uma temperatura elevada sob condições ácidas levam à formação e liberação de uma série de compostos, onde as principais vias de degradação são apresentadas esquematicamente na Figura 21. Quando a hemicelulose é degradada, a xilose, manose, ácido acético, galactose e glicose são liberados, bem como a celulose é hidrolisada em glicose. Em temperaturas e pressões elevadas a xilose é ainda mais degradada em furfural,

e de modo similar, o 5-hidroxi metil furfural (HMF) é formado a partir da degradação de hexoses. O ácido fórmico é formado quando o furfural e HMF são clivados, o ácido levulínico a partir da degradação de HMF, e os compostos fenólicos são gerados a partir da desagregação parcial da lignina. É sabido que a temperatura de hidrólise, tempo e concentração ácida influenciam na geração de inibidores fermentativos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

**Figura 21** - Reações que ocorrem durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos.



Derivados de furanos e de compostos fenólicos irão reagir ainda mais para formar um material polimérico.

Fonte: Adaptado de PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL (2000).

### 3.8.1 Ácidos carboxílicos

Os hidrolisados de lignocelulose contêm ácidos carboxílicos, tais como ácido acético, fórmico e levulínico. O ácido acético é formado principalmente por hidrólise de grupos acetilados da hemicelulose, enquanto que o ácido fórmico e ácido levulínico surgem como produtos de degradação dos polissacarídeos catalisados por ácidos termoquímicos. O ácido fórmico é um produto de degradação de furfural e HMF (5-hidroxi metil furfural), enquanto que o ácido levulínico é formado apenas por degradação do HMF (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Estes ácidos carboxílicos podem inibir o crescimento celular, pois são lipossolúveis e podem difundir-se através da membrana plasmática. O efeito inibitório sobre o crescimento de microrganismos tem sido proposto devido ao influxo de ácido não dissociado para o citosol, ocorrendo neste último a dissociação do ácido devido ao pH intracelular

inicialmente neutro, diminuindo assim o pH citosólico e inibindo a proliferação e viabilidade celular (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989).

Estresse ácido pode ocorrer quando o pH extracelular é menor do que o pKa do ácido (constante logarítmica de dissociação do ácido). Se o pH é superior ao pKa, a forma dissociada do ácido fora das células é abundante e isso é relativamente inofensivo em comparação com a sua forma não dissociada. Quando o pH é inferior ao pKa, formas não dissociadas do ácido existem em grande quantidade, os quais podem se difundir mais livremente para dentro da célula do que os ácidos dissociados, que necessitam de transporte específico devido a permeabilidade seletiva da membrana celular. Dentro da célula, a dissociação de ácido resulta no acúmulo de prótons e pode causar acidificação intracelular. Esta acidificação pode resultar na queda de pH intracelular, inibição do crescimento das células e formação de subprodutos e desse modo afetar o metabolismo celular. Além disso, o estresse ácido também leva ao acúmulo de ânions no interior das células, e isto pode conduzir à degradação de vacúolos. Na prática, a produção de etanol decai a um pH igual ou menor do que o pKa 4,8 do ácido acético (NUGROHO; YOSHIKAWA; SHIMIZU, 2015). Em alternativa, pode ocorrer um aumento da produção de etanol à custa da formação de biomassa, como consequência da tentativa da célula para manter um pH intracelular constante através do bombeamento de prótons para fora via ATPases de membrana plasmática (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Concentrações baixas de ácidos carboxílicos parecem exercer um efeito estimulante sobre a produção de etanol por *S. cerevisiae* (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989), onde concentrações de ácido baixas ( $<100 \text{ mmol/L}^{-1}$ ) aumentaram o rendimento de etanol a pH 5,5, ao passo que o rendimento diminuiu com a adição de concentrações mais elevadas destes ácidos.

Em *S. cerevisiae*, a absorção de ácidos orgânicos ocorre tanto por difusão facilitada através do canal FPS1 como por difusão passiva. Em pH citosólico natural, no entanto, a dissociação dos ácidos conduz à liberação de prótons e os respectivos ânions, os quais induzem a acidificação intracelular e a inibição da capacidade fermentativa (TANAKA *et al.*, 2012). A trealose ( $\alpha$ -D-glicopiranosídeo- $\alpha$ -D-glicopiranosil), um dissacarídeo não redutor de glicose, é considerada importante molécula de proteção contra tensões ambientais. A principal função da trealose é proteger proteínas e lípidos inseridos na estrutura de membrana de leveduras contra diferentes condições estressantes, tais como temperatura elevada, alta osmolalidade e congelamento/descongelamento (MAHMUD; HIRASAWA; SHIMIZU, 2010). Os níveis celulares de trealose são controlados por um equilíbrio entre as enzimas de

síntese (TPS1 e TPS2) e enzimas de degradação (NTH1 e NTH2) (JULES et al., 2008). Uma pesquisa realizada por Yoshiyama e cols. (2015) avaliou mutantes com deleção do gene da enzima trealase, que acumularam níveis elevados de trealose e mostraram significativa tolerância ao estresse frente ao ácido acético. Tais autores notaram que a trealose pode proteger proteínas e membranas celulares da desnaturação causada pela acidificação intracelular, e seus resultados sugeriram fortemente que o acúmulo de trealose melhora a capacidade de fermentação na presença de ácido acético. O acúmulo de trealose pode, portanto, ser considerado um alvo na criação de estirpes de leveduras tolerantes ao ácido acético (YOSHIYAMA et al., 2015).

### 3.8.2 Furfural e Hidroximetilfurfural

Os aldeídos derivados de furanos (furfural e HMF) são altamente reativos e também normalmente encontrados em hidrolisados lignocelulósicos, sendo formados pela desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente (Figura 22). Ambos inibem o crescimento de leveduras e diminuem o rendimento e produtividade de etanol (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Em condições anaeróbias, *S. cerevisiae* pode converter o furfural para álcool furfurílico e HMF para 2,5-bis-hidroximetilfurano (PALMQVIST; ALMEIDA; HAHN-HÄGERDAL, 1999). A inibição do crescimento de *Pichia stipitis* por álcool furfurílico e furfural tem sido relatada (WEIGERT et al., 1988), ao passo que foi detectada apenas uma ligeira inibição do crescimento anaeróbio de *S. cerevisiae* (PALMQVIST; ALMEIDA; HAHN-HÄGERDAL, 1999). Em outro estudo foi demonstrado que a taxa de redução do furfural aumentou com o aumento do tamanho do inóculo (BOYER et al., 1992). Para corroborar com esta hipótese, a enzima álcool desidrogenase de leveduras dependente de NADH foi relatada como responsável pela redução de furfural formado durante a hidrólise (TAHERZADEH et al., 1998). Em estudo elaborado por Wang e cols. (2013), realizou-se adaptação com transferências sequenciais para melhoria do comportamento de uma estirpe industrial de *S. cerevisiae* na presença de altas concentrações de inibidores. O resultado mostrou que a cepa tolerante pôde degradar rapidamente o furfural e HMF, e, por conseguinte, conseguiu-se um aumento na taxa de consumo de glicose e produtividade de etanol (WANG et al., 2013).

### 3.8.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos (siringaldeído, 4-hidroxibenzaldeído, catecol, vanilina, ácido 4-hidroxibenzóico, álcool dihidroconiferílico, aldeído coniferílico e ácido siríngico) levam ao rompimento de membranas biológicas e causam perda de integridade, afetando assim a capacidade das mesmas de servir como barreiras seletivas e matrizes para ancoragem de enzimas (HEIPIEPER et al., 1994). Os compostos fenólicos exercem um efeito inibidor considerável na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos. O ácido 4-hidroxibenzóico é utilizado como composto modelo para estudar a influência de compostos fenólicos em fermentação. A escolha do ácido 4-hidroxibenzóico foi baseada na abundância em hidrolisados de madeira, e seu efeito inibidor foi relatado na fermentação com *S. cerevisiae* (1 g L<sup>-1</sup> causou um decréscimo de 30% no rendimento de etanol em comparação com a fermentação controle) de acordo com Ando et al. (1986).

Adicionalmente, *S. cerevisiae* pode converter alguns inibidores fenólicos em compostos menos tóxicos. Por exemplo, aldeído coniferílico é reduzido ao álcool coniferílico e ao álcool dihidroconiferílico. O papel dos inibidores fenólicos tem sido investigado usando catalisadores enzimáticos que afetam especificamente compostos fenólicos sem alterar as outras concentrações de inibidores, tais como ácidos carboxílicos e furanos. Enzimas, tais como as lacases e peroxidases, oxidam fenóis a radicais que sofrem acoplamento de moléculas maiores que são menos tóxicas para os microrganismos fermentativos (JÖNSSON et al., 1998). É sabido que entre vários outros compostos fenólicos, o aldeído coniferílico é particularmente potente na inibição do crescimento de leveduras, além de ser convertido em vários outros metabólitos fenólicos inibidores, portanto, pesquisas com o objetivo de melhorar a capacidade de *S. cerevisiae* para converter este composto através da expressão heteróloga de enzimas que realizam a função semelhante no organismo nativo tem se mostrado promissoras (ADEBOYE et al., 2015). Um estudo recente demonstrou que a expressão de um gene de *P. aeruginosa* que codifica a enzima acetaldeído desidrogenase (Ald5) em *Saccharomyces* leva a conversão eficiente do composto inibidor aldeído coniferílico em ácido cinâmico, conferindo tolerância aumentada à estirpe aos compostos fenólicos (ADEBOYE; OLSSON; BETTIGA, 2016).

### 3.8.4 Outros compostos inibitórios à microbiota fermentativa

O próprio etanol obtido durante a fermentação inibe a viabilidade, o crescimento, os sistemas de transporte da glicose e o fluxo de prótons em *S. cerevisiae*. A membrana plasmática da levedura é afetada no que diz respeito à permeabilidade, organização e composição lipídica. No entanto, os microrganismos etanologênicos *S. cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* podem tolerar concentrações de etanol até mais de 18% e 12%, respectivamente (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Pesquisa recente de genômica mostrou que vários compostos (trealose, valina, prolina e inositol) contribuem para que a levedura suporte elevada concentração de etanol, e a eliminação de genes LEU4 e LEU5 que levam ao acúmulo de valina, bem como a deleção de INM1 e INM2 que levam à redução de inositol fornecem uma tolerância significativa ao etanol (OHTA et al., 2016). Outra abordagem investigou a sobre-expressão em *S. cerevisiae* de uma bomba de efluxo (ADP1) capaz de exportar solvente, o que levou a um aumento da tolerância ao estresse induzido por etanol, e uma produtividade de 50% superior à estirpe selvagem (YANG et al., 2013). Zhang M. e cols. (2014) criaram uma cepa recombinante utilizando radiação a laser (266nm) submetida a cultivos repetidos, onde tal estirpe de *Saccharomyces* foi capaz de crescer em meio contendo 15% de etanol (v/v), com um desempenho de produção de etanol 29% melhor em comparação com a estirpe selvagem mantida em meio contendo apenas 5% de etanol (v/v). Tais exemplos ilustram o potencial da abordagem de metabolômica na identificação de genes alvo para o melhoramento de estirpes com tolerância superior ao etanol (ZHANG et al., 2014).

Íons inorgânicos presentes em hidrolisados de lignocelulose originam-se a partir das matérias-primas, a partir de produtos químicos adicionados durante o pré-tratamento, condicionamento e hidrólise, e ainda a partir dos equipamentos de processo. A adição de sais resulta em uma pressão osmótica mais elevada, o que pode culminar em efeitos inibitórios. *S. cerevisiae* é relativamente tolerante ao sal em comparação com outras leveduras, tais como *Schizosaccharomyces pombe* e *Pichia stipitis*, mas menos tolerante do que *Candida* sp. No meio à base de glicose, *S. cerevisiae* é capaz de crescer em uma solução de cloreto de sódio a 1,5 M. No entanto, um fator mais importante do que a concentração absoluta de sódio é a relação intracelular de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que preferencialmente deve ser mantido baixo (WADSKOG; ADLER, 2003). Desde que os inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos sejam

identificados, o processo de fermentação pode ser melhorado de várias formas. Em primeiro lugar, a formação de inibidores pode ser minimizada através da otimização das condições de pré-tratamento e de hidrólise. Em segundo lugar, os métodos de detoxificação específicos podem ser desenvolvidos para a remoção eficiente de inibidores antes de se proceder a fermentação.

### **3.9 Detoxificação dos hidrolisados**

A detoxificação é uma etapa de grande importância, pois quanto menor o teor de compostos tóxicos, maiores as chances de a fermentação ocorrer com eficácia. Os compostos inibidores do metabolismo dos microrganismos prejudicam a conversão dos açúcares do hidrolisado no produto que está sendo produzido, como o etanol. Podem ser tomadas várias medidas alternativas para evitar problemas causados por inibidores. As concentrações de inibidores e de açúcares em hidrolisados dependem da matéria-prima, bem como sobre as condições de hidrólise (LARSSON et al., 1999b). Há uma variedade de métodos químicos, biológicos e físicos que podem ser utilizados para detoxificar hidrolisados (PARAWIRA; TEKERE, 2011; TAHERZADEH; KARIMI, 2011; LUDWIG et al., 2013; TESFAW, ASSEFA, 2014). As abordagens incluem supercalagem e tratamentos com produtos químicos, extração líquido-líquido, extração líquido-sólido, o aquecimento e a evaporação, tratamentos com microrganismos e biocatalisadores enzimáticos (Tabela 9). Na comparação dos métodos de detoxificação, o tratamento com hidróxido de cálcio (supercalagem) tem emergido como um dos métodos mais eficientes devido à precipitação eficiente de substâncias tóxicas, e em muitos casos, parece ser a escolha mais econômica, no entanto, é preciso implantar um sistema para que o precipitado formado seja removido (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).



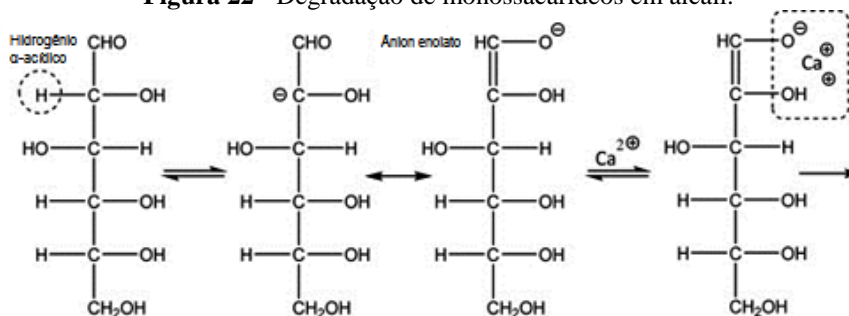
**Tabela 9.** Técnicas utilizadas na detoxificação de hidrolisados lignocelulósicos e suspensões.

| Técnica                   | Procedimento  |
|---------------------------|---|
| Aditivos químicos         | Alcalino (como Ca(OH) <sub>2</sub> , NaOH, NH <sub>4</sub> OH)<br>Agentes redutores (tais como ditionito, ditioneitol, sulfito) |
| Tratamento enzimático     | Lacase<br>Peroxidase  |
| Aquecimento e vaporização | Evaporação<br>Tratamento de calor   |
| Extração líquido-líquido  | Acetato de etila<br>Extração com fluido supercrítico (tais como CO <sub>2</sub> supercrítico)                                   |
| Extração líquido-sólido   | Carvão ativo<br>Troca iônica<br>Lignina   |
| Tratamento microbiano     | <i>Coniochaeta ligniaria</i><br><i>Trichoderma reesei</i><br><i>Ureibacillus thermosphaericus</i>                               |

Fonte: Adaptado de JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT (2013).

Detoxificação de hidrolisados lignocelulósicos por tratamento alcalino, isto é, aumentando o pH para 9-10 com Ca(OH)<sub>2</sub> (supercalagem) e posterior reajustamento para pH 5,5 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tem resultado em melhor detoxificação do que o ajuste do com NaOH, e embora ainda não claramente compreendida, este tipo de detoxificação pode ser devido à precipitação de compostos tóxicos e à instabilidade ou conversão química de alguns inibidores a pH elevado (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; TESFAW; ASSEFA, 2014). Porém, pode ocorrer um problema na detoxificação alcalina, pois não só os inibidores são afetados pelo tratamento, mas também os açúcares, o que pode conduzir a rendimentos reduzidos de etanol. Nilvebrant et al. (2003) estudaram os efeitos do tempo, temperatura, e pH durante o tratamento alcalino de um hidrolisado e observaram que a xilose foi mais facilmente degradada do que os outros monossacarídeos, e uma degradação mais extensa durante o tratamento alcalino por supercalagem, que pode ser atribuída à estabilização de intermediários reativos (enolatos) por íons de cálcio (Figura 22).

**Figura 22 -** Degradação de monossacarídeos em álcali.



Fase inicial da degradação da glicose durante o tratamento alcalino, onde íons de cálcio estabilizam o intermediário de enol reativo, que por sua vez é degradado em HMF, e posteriormente em ácidos fórmico e levulínico. Fonte: NILVEBRANT et al. (2003).

Outro tratamento químico que tem emergido como eficaz é o de suplementação de carvão ativado em hidrolisados de biomassa, capaz de reduzir inibidores e também encurtar o tempo de fermentação, pois são adequados para remover inibidores devido à sua elevada capacidade de adsorção (KIM et al., 2013). Efeitos sinérgicos de métodos de detoxificação já foram investigados, tais como supercalagem e em seguida método de adsorção sobre resinas de troca iônica, e supercalagem e adição seguida de método de carvão ativado, levando a uma maior redução dos compostos inibidores em comparação com um método isoladamente (TESFAW; ASSEFA, 2014).

A utilização de grandes inóculos também diminui os problemas de inibição. No entanto, é considerada uma solução menos atrativa num contexto industrial, pois se o caldo de fermentação usado contém grande quantidade de sólidos, a separação da levedura pode tornar-se uma tarefa tediosa (PIENKOS; ZHANG, 2009). Outras possibilidades que têm como alvo o microrganismo incluem a seleção de espécies e estirpes microbianas que apresentam resistência a inibidores. Adaptação do microrganismo a um ambiente de inibição, possivelmente após a indução de variação por mutagênese serve como uma opção alternativa. Além disso, a engenharia genética pode ser empregada para se obter cepas hiper-resistentes (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). *S. cerevisiae* transformada foi desenvolvida para aumentar a resistência a inibidores de fermentação por sobre-expressão de enzimas que conferem resistência melhorada a compostos fenólicos (LARSSON; CASSLAND; JÖNSSON, 2001), furanos (PETERSSON et al., 2006; GORSICH et al., 2006), e ácidos carboxílicos (HASUNUMA et al., 2011).

A detoxificação pode ser necessária quando hidrolisados fortemente inibidores são fermentados, se concentrações elevadas de inibidores acumulam-se no aparelho de fermentação devido à recirculação das correntes, ou quando um microrganismo fermentativo com baixa tolerância ao inibidor é usado (LARSSON et al., 1999a). Portanto, o método de detoxificação deve remover seletivamente inibidores, ser barato, fácil de integrar no processo e ser necessário ao mesmo (PALMQVIST, HAHN-HÄGERDAL, 2000).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Biopolímeros do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP, Campus de São José do Rio Preto/SP.

### **4.1 Resíduos de Mandioca**

Os resíduos de mandioca de variedades distintas foram fornecidos pela indústria produtora de farinha Moreá Alimentos Ltda., localizada no município de Monte Alegre de Minas/MG, e consistiram das cascas, entrecasas e pontas descartadas durante o processamento da matéria-prima para produção de farinha. Antes do procedimento de hidrólise, o material foi lavado, a fim de se retirar as sujidades, e então seco ao sol durante 48 horas, até atingir umidade aproximada de 12% (CALDAS NETO et al., 2000). Posteriormente, os resíduos foram triturados em moedor elétrico adaptado para aumentar a superfície de contato, e por fim armazenados em recipientes plásticos. O tamanho de partícula foi homogeneizado em  $\leq 0,64$  mm utilizando um tamizador da marca Produtest.

### **4.2 Hidrólise dos resíduos de mandioca**

#### *4.2.1 Padronização*

As hidrólises foram realizadas utilizando concentrações de 0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3%; 3,5%; 4%; 4,5% e 5% (v/v) de ácido sulfúrico, em duplicata. Para isto, pesou-se 10g dos resíduos de mandioca previamente triturados em Erlenmeyers de 250 mL e adicionaram-se 50 mL da respectiva concentração ácida. Os hidrolisados foram tratados com e sem aquecimento. Com aquecimento, os Erlenmeyers foram mantidos em autoclave a 121°C 1kgf/cm<sup>2</sup> nos tempos de 5, 10 e 15 minutos. Os Erlenmeyers que não sofreram aquecimento permaneceram em temperatura ambiente (próxima a 28°C) nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

Ao final de cada hidrólise com aquecimento, os Erlenmeyers foram deixados em

temperatura ambiente até resfriamento, e ajustou-se o pH para 5,5, 6,0 e 6,5 com hidróxido de sódio 50% (m/m). Cada hidrolisado foi centrifugado a 3600 rpm por 20 minutos, para separação dos resíduos remanescentes. Após centrifugação, filtrou-se o hidrolisado em papel de filtro Whatman nº 1 para remoção completa do resíduo de mandioca (torta remanescente). Todos os filtrados foram armazenados em frascos com tampa abaixo de 0°C. Durante o preparo dos meios para fermentação, os hidrolisados foram concentrados em banho-maria a 70°C até redução de 50% do volume inicial quando necessário. Em cada hidrolisado foram determinados açúcares totais (DUBOIS et al., 1956); açúcares redutores (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952) e compostos fenólicos (CHAOVANALIKIT; WROLSTAD, 2004).

#### 4.2.2 Detoxificação

Neste procedimento foi adicionado carvão ativado em pó na proporção de 1g de carvão para 40 mL de hidrolisado. A mistura sofreu agitação em incubadora orbital refrigerada (*shaker*) durante 1 hora a 200 rpm e 30°C, centrifugação a 2000g por 30 minutos e posterior filtração em papel de filtro Whatman nº 1. Procedeu-se com a análise de açúcares redutores (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952) e compostos fenólicos (CHAOVANALIKIT; WROLSTAD, 2004) antes e após cada etapa de desintoxicação. Por fim, o sobrenadante obtido foi armazenado em temperatura abaixo de 0°C, onde os hidrolisados brutos e detoxificados serviram como meios fermentativos.

### 4.3 Microrganismo e Meios de Cultura

#### 4.3.1 Levedura

A levedura utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602.

#### 4.3.2 Meio para armazenamento, enriquecimento e pré-fermentação

O meio utilizado para armazenamento da levedura foi chamado de ágar *Saccharomyces cerevisiae* (ASC). Este meio foi composto por (g L<sup>-1</sup>): extrato de malte, 3; extrato de levedura, 3; peptona, 5; glicose, 10; e ágar, 20. As células foram armazenadas em temperatura de 4°C. O meio utilizado para enriquecimento foi chamado de caldo

*Saccharomyces cerevisiae* (CSC). Este meio continha os mesmos reagentes que o ASC, exceto ágar, obtendo assim um meio líquido (caldo).

#### 4.3.3 Meio para fermentação e preparo do pré-inóculo

O meio utilizado na fermentação com a levedura foi proposto por Patle e Lal (2008) com modificações e continha, em g L<sup>-1</sup>: MgSO<sub>4</sub>, 1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; Extrato de levedura, 5. A este meio adicionou-se separadamente glicose, hidrolisado detoxificado ou hidrolisado sem detoxificar nas respectivas concentrações. Os meios de cultura foram chamados de sintético, com hidrolisado detoxificado e com hidrolisado bruto, respectivamente.

A cepa de *S. cerevisiae* ATCC 26602 foi repicada em tubos contendo CSC e incubada a 30°C por 24 horas para adaptação prévia. Após 24 horas de pré-inóculo, 10 tubos com a cultura crescida foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de CSC, incubados em shaker orbital com controle de temperatura a 30 °C sem agitação, por 24 horas. Posteriormente, a massa celular foi centrifugada e suspensa em água destilada esterilizada para homogeneização do inóculo (LORENZETTI; MORO; GARCÍA-CRUZ, 2014).

#### 4.4 Fermentação

Foram realizados experimentos para observar a produção de bioetanol pela levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602, e todas as fermentações ocorreram em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL dos meios de cultura. Os fatores testados se basearam em estudos semelhantes ou que utilizaram o mesmo micro-organismo (MOSHI *et al.*, 2015; OLANBIWONINU; ODUNFA, 2015; KONGKIATTIKAJORN; SORNVORAWAAT, 2011; BAYITSE *et al.*, 2015). Assim, as condições aplicadas para a levedura foram temperatura de 25, 30, 35 e 40°C; concentração inicial de substrato de 25, 50 e 75 g L<sup>-1</sup>; agitação 0, 75 e 150 rpm conforme pode ser observado na Tabela 10; pH fixado em 6,5 de acordo com padronização realizada em experimentos anteriores; após realizada fermentação prévia de 24 horas para se observar o comportamento da levedura, foi selecionado o melhor tempo para produção de bioetanol e com isso fixado em 12 horas conforme avaliado. Foram retiradas alíquotas nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, para análises posteriores. Os valores de pH

dos meios de cultura foram ajustados, quando necessário, com NaOH 50% (m/m) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% (v/v).

**Tabela 10.** Variáveis utilizadas nas fermentações para *Saccharomyces cerevisiae*.

| Variáveis                           | Níveis |    |     |    |
|-------------------------------------|--------|----|-----|----|
| Açúcar Redutor (g L <sup>-1</sup> ) | 25     | 50 | 75  | -  |
| Agitação (rpm)                      | 0      | 75 | 150 | -  |
| Temperatura (°C)                    | 25     | 30 | 35  | 40 |

#### 4.4.1 Padronização do Inóculo

Para padronizar o inóculo repetiram-se as etapas para crescimento descritas no Apêndice 4. Posteriormente, em uma cubeta de espectrofotômetro contendo 3 mL de água destilada, gotejou-se a suspensão contendo a levedura até atingir absorvância de 0,450. Por meio de uma regra de três foi quantificado o volume inicial da mesma em cada erlenmeyer para fermentação. Procedeu-se a padronização do inóculo por meio de uma curva padrão na qual o crescimento da levedura foi determinado realizando diluições. Cada uma das diluições foi lida em espectrofotômetro Biochrom Libra S22 com comprimento de onda de 600 nm. A curva foi constituída por peso seco (g) *versus* absorvância.

#### 4.4.2 Meio Sintético

Nas fermentações realizadas utilizando meio sintético, o hidrolisado foi substituído por glicose (substrato). As condições usadas foram citadas no item 4.4 de acordo com a Tabela 10. Todas as amostras sem agitação foram incubadas em estufa B.O.D. e as amostras com agitação foram incubadas em incubadora horizontal (*shaker*) com agitação e temperatura controlada. Após cada tempo de fermentação, determinou-se o crescimento por absorvância a 600 nm, bem como o pH. O restante do meio foi centrifugado a 3600 rpm por 15 min para separar as células do meio e também foi captada uma alíquota para análise de etanol (item 4.5.5).

#### *4.4.3 Meio com Hidrolisado Detoxificado*

Nesta fermentação, o substrato utilizado foi o meio hidrolisado detoxificado. Repetiram-se as etapas descritas no item 4.4.2.

#### *4.4.4 Meio com Hidrolisado sem Detoxificar (Hidrolisado Bruto)*

Nesta fermentação, o substrato utilizado foi o meio hidrolisado sem detoxificado. Repetiram-se as etapas descritas no item 4.4.2.

### **4.5 Métodos Analíticos**

#### *4.5.1 Determinação de Açúcares Totais (AT)*

Em tubo de ensaio, foram colocados 0,5 mL do hidrolisado (diluído em água destilada quando necessário), 0,5 mL de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Deixou-se reagir esta mistura por 20 minutos à temperatura ambiente e determinou-se a concentração de açúcares totais usando um espectrofotômetro a 490 nm (DUBOIS *et al.*, 1956).

#### *4.5.2 Determinação de Açúcares Redutores (AR)*

Em tubo de ensaio, foram colocados 0,5 mL do hidrolisado (diluído em água destilada quando necessário), 0,5 mL do reagente de Somogyi e deixou-se em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 0,5 mL do reagente de Nelson e 3,5 mL de água destilada e determinou-se a concentração usando um espectrofotômetro a 540 nm (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952).

#### *4.5.3 Determinação de Glicose*

Foram utilizados tubos de ensaio rotulados como B (branco), T (teste) e P (padrão). Procedeu-se conforme descrito abaixo na adição do volume de amostra, reagente de coloração e a solução padrão para realizar a reação enzimática:

|                        | <b>B</b> | <b>T</b> | <b>P</b> |
|------------------------|----------|----------|----------|
| <b>Reagente de cor</b> | 1,0 mL   | 1,0 mL   | 1,0 mL   |
| <b>Solução padrão</b>  | -        | -        | 10µL     |
| <b>Amostra</b>         | -        | 10µL     | -        |

Após esta etapa de preparo das soluções, as amostras foram misturadas vigorosamente por agitação e posteriormente incubadas durante 10 minutos em banho maria (37°C). Por fim, após retiradas as amostras do banho-maria foi realizada leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (510nm), zerando o aparelho com o branco. Quanto maior a concentração de glicose presente nas amostras, mais intensa a coloração rosa apresentada pela reação enzimática da  $\beta$ -glicosidase em presença do substrato, conseqüentemente, maiores as leituras no espectrofotômetro foram observadas. A cor final da reação permaneceu estável por 20 minutos à temperatura ambiente, onde as absorvâncias das amostras sobre a absorvância apresentada pelo padrão do fornecedor do kit enzimático forneceram a concentração final de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) presente na amostra, de acordo com a equação 1 (DOLES<sup>TM</sup>).

$$\text{Glicose (g L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{absorvância teste}}{\text{absorvância padrão}} \quad (\text{Equação 1})$$

#### 4.5.4 Determinação de Compostos Fenólicos

Em tubo de ensaio, foram colocados 0,5 mL do hidrolisado (diluído em água destilada quando necessário), 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de água destilada. O tubo de ensaio foi deixado reagir por 10 minutos ao abrigo de luz. Posteriormente, adicionaram-se 1,5 mL de carbonato de sódio a 20% (m/m) e foi colocado em banho-maria por 20 minutos a 40°C. Por fim, os compostos fenólicos foram determinados por espectrofotometria a 755 nm (CHAOVANALIKIT, WROLSTAD, 2004).

#### 4.5.5 Determinação de etanol

A quantificação de etanol após cada fermentação foi realizada em Cromatógrafo Gasoso (CG) Modelo Focus (*Thermo Scientific*) com detector de ionização de chamas (FID) e



coluna HP-FFAP 16 (25m x 0.2mm x 0.3um), mantidas a 70 °C, de acordo com o método utilizado por Ernandes e Garcia-Cruz (2009).

#### 4.5.6 Produtividade

A produtividade (P) foi determinada por meio da equação 2, a qual relaciona o n° em gramas de bioetanol produzido pelo n° em horas do tempo de fermentação.

$$P = \frac{(P_f - P_0)}{(t_f - t_0)} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

P = produtividade (g L.h)

P<sub>0</sub> = massa em gramas inicial de produto

P<sub>f</sub> = massa em gramas final de produto

t<sub>0</sub> = tempo em horas inicial

t<sub>f</sub> = tempo em horas final

#### 4.6 Análise Estatística

As diferentes produções de bioetanol, biomassa e produtividade foram avaliadas estatisticamente para cada experimento, com significância de 5% (p < 0,05) pelo programa Minitab 16.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Padronização da hidrólise ácida dos resíduos de mandioca

Foram realizadas análises das hidrólises ácidas para determinar qual o melhor tempo de contato com a biomassa. Ao final de cada teste de hidrólise, foram analisados e determinados os açúcares totais e redutores, quantificação de glicose apenas para os hidrolisados sem aquecimento, e quantificação de compostos tóxicos presentes. A escolha da melhor hidrólise foi determinada considerando a concentração de ácido que forneceu quantidade satisfatória de açúcares em condições de aquecimento em autoclave a 121°C e 1 kgf/cm<sup>2</sup>, considerando que, mesmo que em uma concentração alta de ácido se consiga extrair mais açúcares, ou o contrário, possa se extrair menos, essa diferença entre a máxima e a mínima extração pode não ser significativa, optando assim, pelo processo que utilizou menos tempo bem como o reagente utilizado, onde se obteve liberação de açúcares satisfatória.

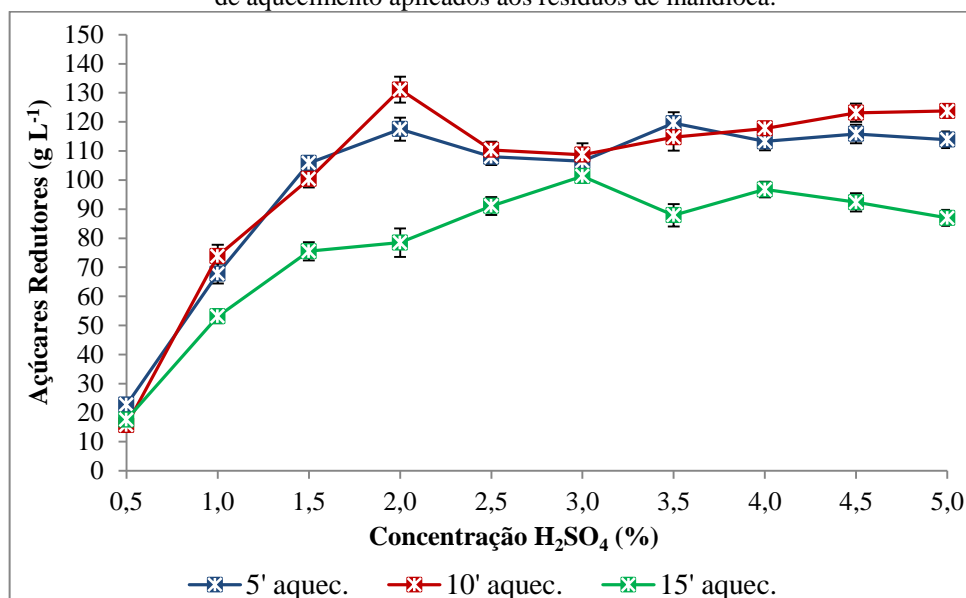
As condições de hidrólise selecionadas foram H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2% (v/v) onde se observou maior liberação de açúcares redutores (134,84 g L<sup>-1</sup>) com aquecimento em autoclave durante 10 minutos de contato do ácido com o resíduo de mandioca (Figura 23). Adicionalmente, nesta concentração ácida o material hidrolisado apresentou-se mais liquefeito, portanto, com maior facilidade de manipulação posterior (filtração e neutralização de pH). Isto é importante, pois o uso de concentrações mais baixas de ácido sulfúrico reduz o risco de corrosão dos fermentadores, libera menor quantidade de compostos tóxicos, além de reduzir custos pela menor quantidade do reagente a ser utilizada, ao passo que temperaturas mais baixas também diminuem custos com energia, tornando o processo mais acessível em relação ao custo-benefício (TOMÁS-PEJÓ et al., 2011).

Teerapatr et al. (2004) hidrolisaram resíduos de mandioca com um mix de celulasas e pectinase a 28°C durante 1 h, seguida por  $\alpha$ -amilase em 100°C durante 2 h e, finalmente, glicoamilase a 60°C durante 4 h. Verificaram que os resíduos de mandioca com concentração inicial de carboidratos não-solúveis em água de 11% (m/v) poderiam produzir 122,4 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores (AR). No presente estudo utilizou-se uma concentração de 20% (m/v) de resíduo de mandioca para proceder a hidrólise ácida, e foram alcançados valores de 134,84 g L<sup>-1</sup> de AR. Os autores citados anteriormente conseguiram atingir quase a mesma quantidade de AR obtido neste trabalho quando aproximadamente metade de substrato foi utilizado na

hidrólise enzimática, visto que esta é mais específica e possui altas taxas de conversão, porém, como observado, a reação perdurou 7 horas, conseqüentemente o gasto energético no processo destes autores acabou tornando-se maior.

Hashem e Darwish (2010) usaram resíduos de batata como fonte econômica de biomassa e produção de bioetanol com mesma levedura. Os resultados demonstraram que 1% de  $H_2SO_4$  a  $100^\circ C$  durante 1h foi suficiente para hidrolisar todo o amido contido no resíduo. Estes autores padronizaram a hidrólise ácida em concentração menor do que a do presente estudo que foi 2%, porém conseguiram a liberação de açúcares redutores próximos a  $18g L^{-1}$ , valores inferiores aos obtidos no presente trabalho ( $\sim 134g L^{-1}$ ); além do que o tempo de reação dos autores foi mais prolongado.

**Figura 23** – Açúcares redutores (AR) liberados utilizando diferentes concentrações de ácido sulfúrico e tempos de aquecimento aplicados aos resíduos de mandioca.



Um estudo realizado por Khawla et al., (2014) investigou o impacto de diferentes concentrações de ácido sulfúrico e clorídrico, bem como comparou hidrólise ácida e enzimática em cascas de batata, e constatou-se que a uma concentração baixa (1%) de  $H_2SO_4$  por 90 minutos foi mais eficiente do que HCl para hidrolisar e que ambos os tratamentos (químico e biológico) apresentaram liberação de açúcares redutores próxima ( $63g L^{-1}$  e  $69g L^{-1}$ , respectivamente). Entretanto, estes rendimentos foram a metade que o relatado pelo presente estudo que obteve aproximadamente  $134 g L^{-1}$  de açúcares após hidrólise ácida do resíduo de mandioca em um tempo de reação nove vezes menor, ou seja, 10 minutos. Estes resultados podem ser explicados pela composição química dos resíduos de mandioca conter

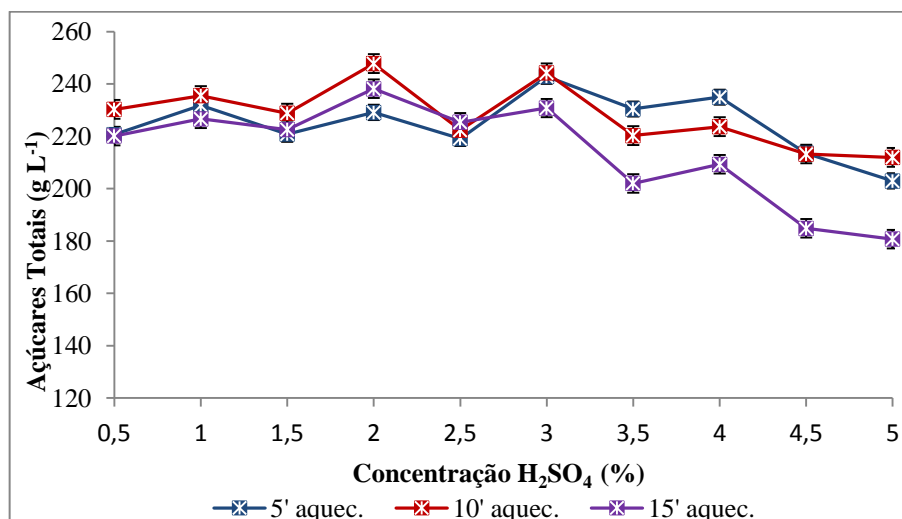
maior quantidade de amido residual do que cascas de batata, e que o material utilizado estava com tamanho de partículas reduzidas, o que facilitou o processo de hidrólise ácida, e consequentemente a liberação de açúcares fermentescíveis.

A Figura 24 faz uma relação entre a quantidade de açúcares totais liberados em todas as concentrações de ácido sulfúrico (0,5 a 5,0%), bem como em todos os tempos de reação com aquecimento em autoclave durante 5, 10 e 15 minutos. Não foram realizados testes de hidrólise utilizando água, devido à composição mista do resíduo de mandioca conter além da base lignocelulósica, amido residual proveniente da polpa, que ao ser diluído em água e submetido à altas temperaturas acaba por gelatinizar, o que inviabiliza o material para posterior análise. Além do mais, a hidrólise utilizando somente água é espontânea, entretanto o processo é lento, por isso o uso de ácidos concentrados ou diluídos, bases e enzimas atuam como catalizadores hidrolíticos (OGEDA; PETRI, 2010). Ainda na Figura 24 pode-se observar que a maior liberação de açúcares totais foi de 254,86 g L<sup>-1</sup> com concentração ácida a 2,0% (v/v) e 10 minutos de aquecimento, o que corroborou na escolha da padronização da hidrólise ácida nesta concentração, visto que tanto para os açúcares totais e redutores, as maiores liberações ocorreram nas mesmas condições (10 minutos de reação; concentração ácida 2%). Em estudos prévios realizados por Trinca (2014), onde foi padronizada a hidrólise ácida com casca de soja, utilizou-se 1,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 15 minutos de aquecimento em autoclave, obtendo-se assim liberação de 30,4 g L<sup>-1</sup> e 64,7g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores e totais, respectivamente. Quando comparados os resultados obtidos pela autora com os do presente estudo (134,84 g L<sup>-1</sup> AR, 254,86 g L<sup>-1</sup>AT), pode-se verificar que tais valores foram quase que o quádruplo, mesmo utilizando um tempo de reação menor e concentrações ácidas próximas, o que revela que o resíduo de escolha, além de sua composição química e grande disponibilidade, apresenta vasto potencial na produção de bioetanol, visto que os índices de açúcares fermentescíveis disponíveis, como a glicose, superam de longe o de outros resíduos agroindustriais já pesquisados em nosso laboratório. O mesmo pode ser observado em relação ao descrito por Furlan (2015), que selecionou como padrões no hidrolisado de bagaço e engaço de uva 1,5% (v/v) de ácido sulfúrico, durante 5 minutos de aquecimento em autoclave, obtendo em média concentrações de 17,5 g L<sup>-1</sup> e 32,5 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores e totais, respectivamente, para a mistura de bagaço e engaço de uva (1:1).

Em uma pesquisa realizada por Srinorakutara et al. (2008), resíduos da mandioca (50 g) foram hidrolisados com 100 mL (1:2 m/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a várias concentrações sob temperaturas de 60-120 °C. Observou-se que um aumento da temperatura de 60° C para 110

°C resultou em maior quantidade de açúcares redutores liberados de 0,5 para 6,1% (m/v), especialmente quando se utilizou 3 e 4M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. No entanto, o aumento do tempo de hidrólise e a temperatura podem aumentar os custos do processo. Um comparativo foi feito neste estudo realizando-se também a hidrólise enzimática com quatro enzimas (celulase, pectinase, α-amilase e glucoamilase) durante 7 horas de hidrólise, e então verificaram que para a mesma quantidade de resíduos de mandioca, a porcentagem de açúcar redutor foi a mesma que para a hidrólise ácida, ou seja, cerca de 6,2% de açúcares redutores. No entanto, optaram pelo pré-tratamento enzimático para a produção de etanol por causa do escurecimento indesejado causado pela hidrólise ácida. Talvez o problema do escurecimento pudesse ser minimizado com a redução do tempo de hidrólise ácida em autoclave, visto que para o presente trabalho foram obtidos elevados índices de açúcares redutores em pouco tempo de reação (10 minutos). Resultados similares de hidrólise ácida de biomassa de casca de mandioca foram relatados por Agu et al. (2006) onde altas concentrações ácidas utilizadas na hidrólise levaram à carbonização, escurecimento e reações de desidratação da matéria-prima em graus variados. As soluções obtidas no presente estudo também mostraram várias cores amarronzadas. Uma explicação poderia ser que outras reações químicas incluindo a formação de furfural a partir de xilose poderiam estar ocorrendo. O furfural foi relatado como inibidor da atividade de algumas enzimas glicolíticas, particularmente desidrogenases em *S. cerevisiae* para produção de etanol. Portanto a hidrólise ácida pode ser eficiente, desde que o tempo de hidrólise e concentração ácida sejam controlados para evitar tais reações (Agu et al. (2006).

**Figura 24** – Açúcares Totais (AT) liberados durante a hidrólise ácida de resíduos de mandioca em diferentes concentrações de ácido sulfúrico e tempos de aquecimento.



Em relação ao parâmetro compostos fenólicos (Figura 25), não foram observadas diferenças significativas em relação aos tempos de aquecimento dos hidrolisados (5, 10 e 15 minutos), porém, a maior liberação ocorreu em concentração de 5% de ácido sulfúrico durante 15 minutos de aquecimento (0,58 mg/g resíduo de mandioca). Foi possível verificar que quanto maior a concentração ácida e o tempo de reação biomassa/ácido sulfúrico em autoclave, no geral, maiores os índices de compostos fenólicos formados. Por exemplo, em 5% de concentração ácida, o acúmulo de compostos fenólicos saltou em 48,5%, 52,63% e 57,5% para os tempos de 5, 10 e 15 minutos de aquecimento respectivamente, quando comparado aos tempos iniciais de reação. Altas concentrações ácidas associadas a um tempo de aquecimento prolongado podem levar a transformação e acúmulo de compostos tóxicos (furfural, hidroximetilfurfural). Em contrapartida, maior a degradação de açúcares disponíveis, além de serem potenciais inibidores fermentativos de certas leveduras e bactérias (MAGALHÃES, 2011).

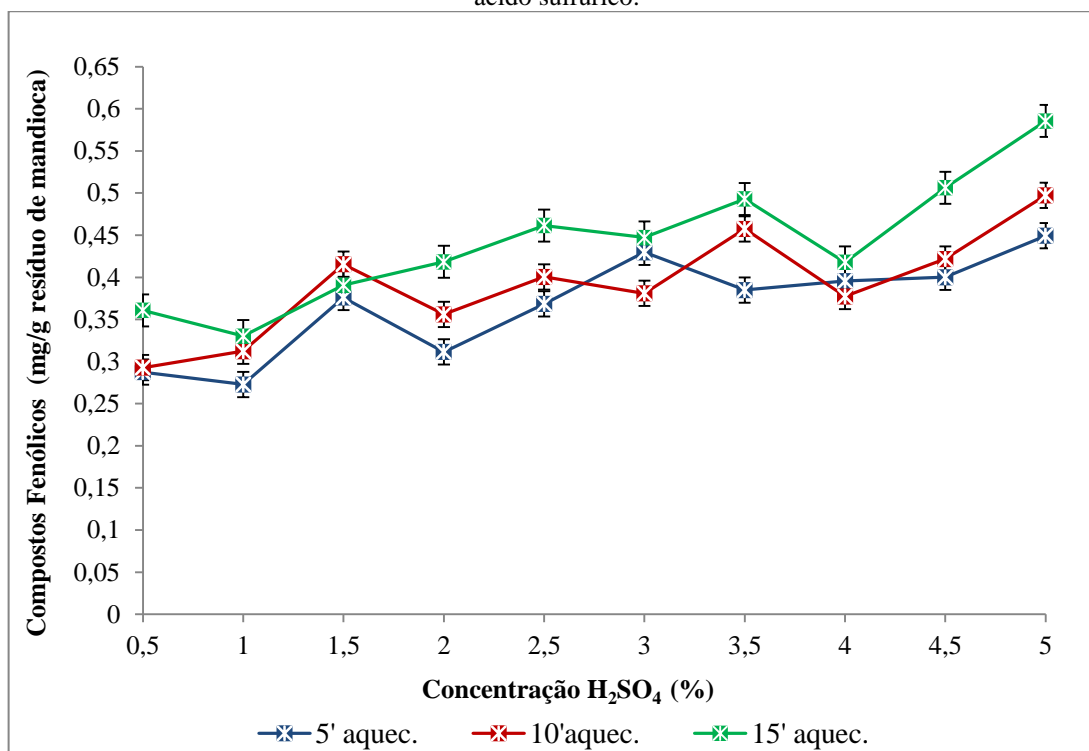
Scordia e colaboradores (2012) realizaram hidrólise da biomassa de cana-de-açúcar com  $H_2SO_4$  na concentração de 4% (v/v) e aquecimento à 121°C por 60 minutos e obtiveram 15 e 78% de glicose e xilose, respectivamente. Quando comparado com o resíduo de mandioca, as concentrações de glicose em hidrolisados sem aquecimento perfizeram mais da metade da composição de todos os açúcares redutores totais (Figura 26), do que de outros açúcares redutores como a xilose, o que de certa forma é um ponto positivo, pois para fermentação utilizando *S. cerevisiae* a glicose é metabolizada com maior eficiência. No hidrolisado de Scordia et al. (2012)., no entanto, houve uma expressiva liberação de compostos fenólicos (4,8 mg/g de resíduo) que juntamente com o ácido acético, foram responsáveis por 44,3% do total de compostos inibidores formados. Resultado semelhante ao anterior foi obtido por Noronha et al. (2010), que utilizaram ácido sulfúrico concentrado em bagaço de cana-de-açúcar com aquecimento a 121°C por 10 minutos, e obtiveram liberação de 4,25 mg compostos fenólicos/g de resíduo. No trabalho realizado por Trinca (2014), também se obteve uma concentração de compostos fenólicos de 1,87 mg/g de casca de soja quando utilizada a mesma concentração de ácido sulfúrico (4%). Na presente pesquisa com resíduos de mandioca, foram observadas baixas taxas de compostos fenólicos na mesma condição ácida citada acima (4%), tendo como resultado a liberação de aproximadamente 0,46 mg/g em ambos os tempos de aquecimento (Figura 25). Esta diferença pode ser explicada pelo menor tempo de permanência da biomassa em autoclave do que nos estudos citados e também devido ao fato dos resíduos utilizados terem composições químicas diferentes. Portanto, como

o resíduo de mandioca possui em sua composição química baixas concentrações de lignina, após sua degradação, houve baixos níveis de compostos fenólicos liberados. De acordo com tais resultados, espera-se que estes baixos níveis de compostos fenólicos não exerçam influência significativa na inibição de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602.

Inibidores aumentam o estresse ambiental para o microrganismo fermentativo ao passo que a concentração de etanol aumenta, visto que ele suporta tensões ambientais até certo limite, resultando em morte celular caso a capacidade da célula frente ao estresse seja excedida (PALMQVIST, HAHN-HÄGERDAL, 2000). O fato de a inibição diminuir consideravelmente ao se remover especificamente os compostos fenólicos implica que estes são os principais inibidores em hidrolisados lignocelulósicos. Apoiando esta observação, demonstrou-se que um hidrolisado de pinheiro foi consideravelmente mais inibitório do que uma fermentação modelo contendo as mesmas concentrações de ácidos carboxílicos, furfural e HMF, mas na ausência de compostos fenólicos (LARSSON et al., 1999 a).

A severidade durante a hidrólise com ácido diluído sobre a concentração de açúcares fermentescíveis e geração de produtos de degradação do açúcar, bem como a capacidade de fermentação de hidrolisado de madeira foi investigada por Larsson et al. (1999 b), através da variação dos parâmetros temperatura (150-240°C), tempo (1-30 min) e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 0,5-4,4% (m/m) de matéria seca. A diminuição da concentração de açúcares fermentescíveis coincidiu com a formação de furfural e HMF que, por sua vez, foram degradados a ácido fórmico e levulínico. A performance fermentativa diminuiu drasticamente à medida que furfural e HMF se acumularam. Para obter ambos os rendimentos elevados de açúcares fermentescíveis e elevado poder de fermentação, tais autores encontraram parâmetros ótimos de 0.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 225°C, 5 minutos de reação e 0.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 210°C, 10 minutos, respectivamente, de acordo com a avaliação do estudo. Uma explicação para a diminuição dos açúcares totais liberados no resíduo de mandioca durante os tratamentos ácidos e tempos de aquecimento aplicados pode ser pelo mesmo motivo citado pelos autores. Como se observa na Figura 24, quanto maior a concentração ácida (acima de 3% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e tempo de tratamento mais prolongado (15 minutos), maior foi a degradação dos açúcares com conseqüente declínio dos mesmos, possivelmente devido a formação de compostos inibitórios secundários como furfural e HMF, porém, que não foram quantificados no presente trabalho.

**Figura 25** – Compostos fenólicos liberados utilizando diferentes tempos de aquecimento e concentrações de ácido sulfúrico.

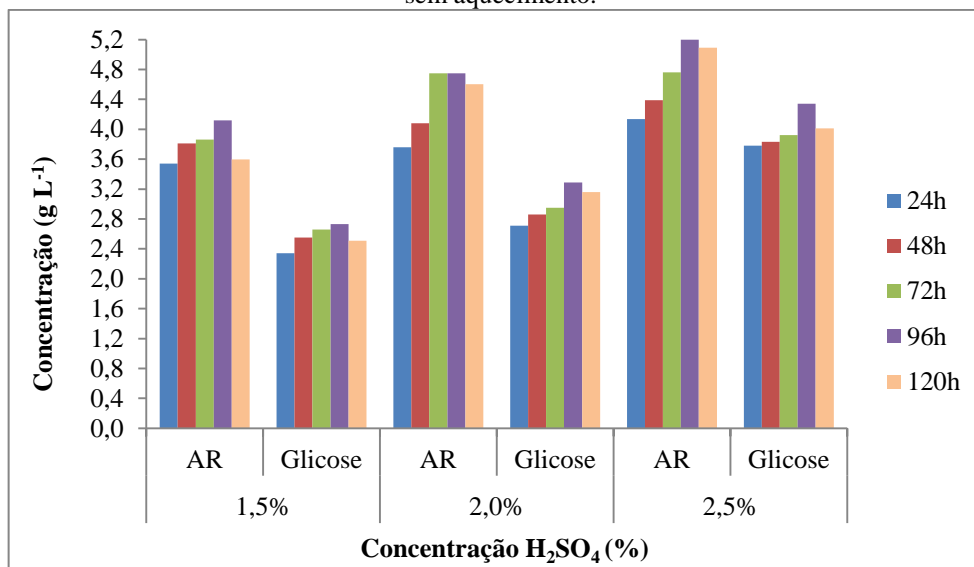


Para se avaliar a eficiência da hidrólise ácida também foram feitos testes em temperatura ambiente, portanto sem aquecimento prévio em autoclave. Para isso, utilizou-se ácido sulfúrico nas concentrações de 1,5%, 2% e 2,5% em duplicata, valores estes intermediários ao ótimo escolhido nas hidrólises ácidas em que se aplicou calor. Na Figura 26 se observam as concentrações de açúcares redutores liberados no decorrer do tempo em diferentes concentrações ácidas de hidrólise. Destes, a maior parte consistiu de glicose e o restante dos demais açúcares redutores não foram identificados, mas que segundo a literatura, é xilose, um dos açúcares provenientes da quebra da hemicelulose (RITTER, 2008). Além disso, ficou constatado que apesar dos maiores índices de liberação de açúcares redutores totais e glicose ocorrerem em concentração de 2,5% de ácido sulfúrico durante 96 horas de tratamento (5,20 g L<sup>-1</sup> e 4,34 g L<sup>-1</sup>, respectivamente), é um valor muito baixo quando comparado aos resultados onde se aplica calor nos hidrolisados, tornando o processo sem aquecimento completamente inviável a nível industrial, por conta da baixa liberação de açúcares fermentescíveis, bem como o longo tempo de reação. Isso acaba justificando os custos energéticos com autoclaves para se distribuir calor na biomassa que consiste na matéria-prima base para a obtenção dos hidrolisados para posterior fermentação, onde estes



equipamentos juntamente com a adição de ácido atuam como catalizadores acelerando assim o tempo de reação da hidrólise da biomassa.

**Figura 26** – Açúcares redutores totais e glicose liberados durante a hidrólise ácida dos resíduos de mandioca sem aquecimento.



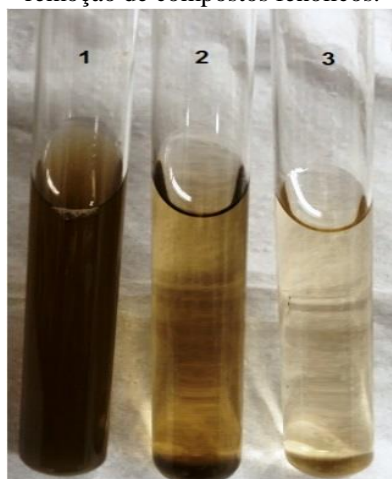
Lu e colaboradores (2007) realizaram pré-tratamento em palha de milho nas concentrações de ácido sulfúrico a 2%, 4% e 6% variando temperaturas entre 80, 100, e 120°C. Com isso observaram que as condições ótimas para o pré-tratamento foram 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e tempo de reação de 43 min a 120°C. Isto implica que um fator significativo no tratamento de biomassa agroindustrial é a aplicação de calor (LU et al., 2007; TRINCA, 2014; FURLAN, 2015), no qual em testes descritos anteriormente por nosso grupo de estudos com os resíduos de mandioca em concentração deste ácido a 2%, seguido de aquecimento durante apenas 10 minutos a 121°C, conseguiu um rendimento mais satisfatório em açúcares redutores (134,84 g L<sup>-1</sup>) conforme a Figura 23, o que teria grande impacto tanto econômico quanto na redução do tempo durante o processo de hidrólise ácida para posterior produção de etanol em refinarias de pequena e grande escala.

## 5.2 Detoxificação do hidrolisado

A detoxificação teve como finalidade reduzir compostos inibidores gerados durante a etapa de hidrólise ácida (Figura 27). Para isto, foram realizadas análises dos compostos

fenólicos no hidrolisado bruto (antes do processo de detoxificação) e após este processo foi novamente realizada a quantificação dos compostos fenólicos para o hidrolisado detoxificado. A Tabela 11 mostra a concentração dos compostos fenólicos do hidrolisado bruto (HB) e do hidrolisado detoxificado (HD) submetidos à fermentação.

**Figura 27** - Hidrolisados de resíduos de mandioca após a etapa de detoxificação por carvão ativado para remoção de compostos fenólicos.



Nota-se que o hidrolisado bruto obtido mostrou uma coloração escura e turva (1) e à medida que se realizou o primeiro ciclo de detoxificação (2) e o segundo (3) obteve-se um material mais claro e translúcido, pois ao passo que os compostos fenólicos exercem efeito inibitório sobre o microrganismo ele também é responsável pela coloração e turvação do meio de cultivo.

**Tabela 11.** Compostos fenólicos dos hidrolisados, antes e após o processo de detoxificação.

| Meio                                | Compostos fenólicos (mg/g de resíduo de mandioca) | Desvio padrão ( $\sigma$ ) | p-valor |
|-------------------------------------|---|----------------------------|---------|
| Hidrolisado Bruto                   | 0,39  | 0,05                       |         |
| Hidrolisado Detoxificado (1º ciclo) | 0,18  | 0,03                       | 0,002   |
| Hidrolisado Detoxificado (2º ciclo) | 0,05  | 0,02                       |         |

Na Tabela 11 pode-se observar que quando se compara a quantidade de compostos fenólicos para cada hidrolisado, a diferença entre eles foi significativa ( $p=0,02$ ), ou seja, de fato o processo de detoxificação foi efetivo. No entanto, quando se procedeu a fermentação com ambos os hidrolisados com e sem detoxificação, o hidrolisado bruto apresentou melhores resultados, portanto não ocorreu inibição microbiana pela presença de compostos fenólicos (Figura 29).

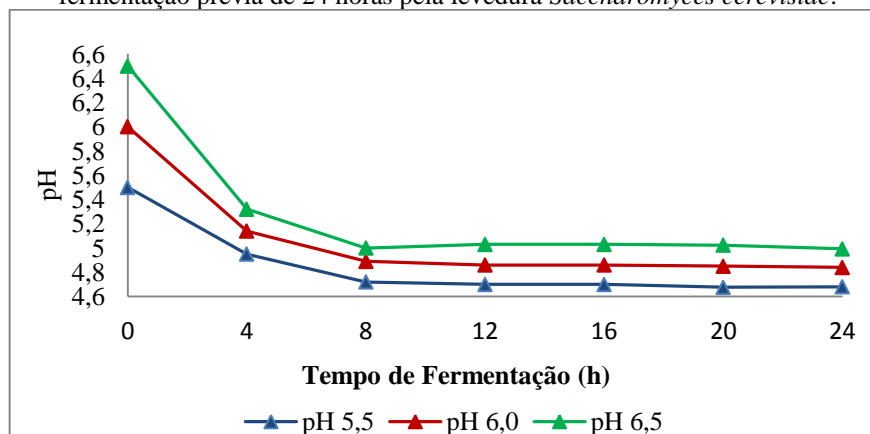
### 5.3 Fermentação Prévia

Neste experimento foram realizados testes com os três meios de cultura, Meio Sintético; com Hidrolisado Detoxificado; e com Hidrolisado Bruto para se avaliar o comportamento da levedura estudada. As condições testadas foram: Temperatura (30°C), pH (5,5, 6,0 e 6,5), fermentação de 24 horas, sem agitação, concentração de açúcar redutor de 50 g L<sup>-1</sup>.

#### 5.3.1 Variação de pH

Os hidrolisados brutos que serviram como substratos dos meios de cultura para a fermentação tiveram o pH inicial de 6,5, 6,0 e 5,5. A Figura 28 mostra a redução do pH conforme evoluiu o tempo de fermentação. É possível observar que ambas as amostras tiveram redução acentuada do pH durante as primeiras 8 horas de fermentação, e após este período se mantiveram praticamente constantes. Os pHs no final das 24 horas de fermentação se mantiveram em 4,99, 4,84 e 4,68, respectivamente. O mesmo comportamento ocorreu no trabalho de Trinca (2014), que iniciou sua fermentação com pH 6,0 e decorridas 72 horas o pH reduziu em torno de 4,5. Como pode ser observado, o comportamento da levedura frente a diminuição gradativa de pH foi semelhante para as três faixas de pH testadas inicialmente. Fica demonstrado que após 8 horas de fermentação, o meio pode se tornar estressante para a levedura devido ao pH mais ácido decorrente da formação de produtos microbianos, ou seja, o próprio metabólito secundário formado pela levedura, no caso o etanol, pode atuar como inibidor negativo para a mesma.

**Figura 28** – Variação do pH nos hidrolisados brutos utilizados como substratos nos meios de cultura para fermentação prévia de 24 horas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



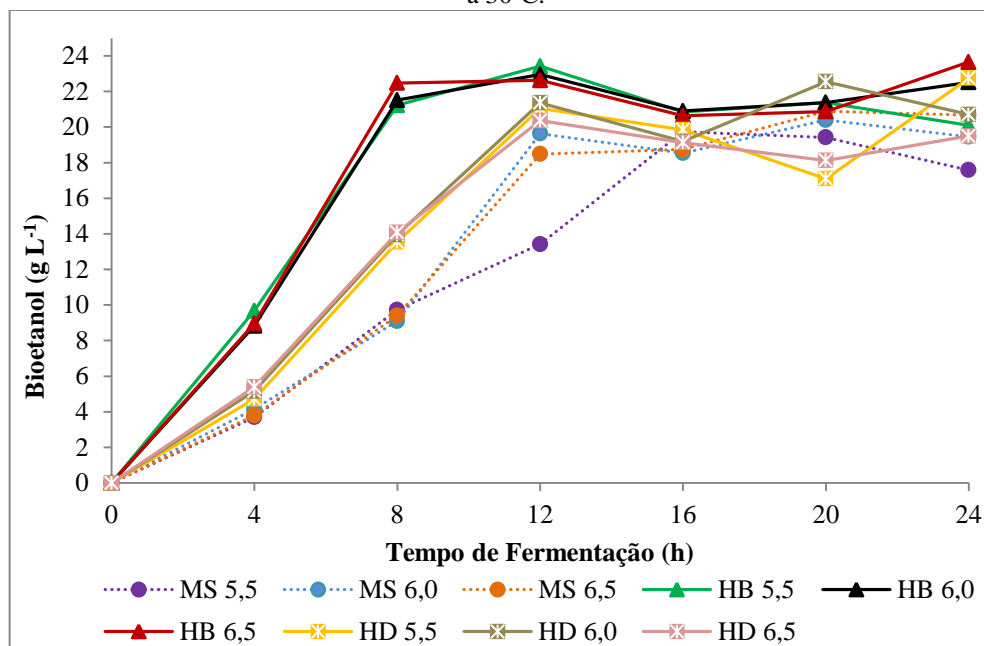
Como discutido em tópicos anteriores, o pH pode exercer papel importante frente à inibição fermentativa, e conseqüentemente levar à alteração do metabolismo celular. No interior da levedura, a dissociação de ácido resulta no acúmulo de prótons e pode causar acidificação intracelular, inibição do crescimento, formação de subprodutos e radicais livres, destruição de vacúolos, etc. A célula, para contrabalancear esta adversidade, possui mecanismos que atuam na tentativa de manter um pH intracelular constante através do bombeamento de prótons para o meio extracelular via ATPases de membrana plasmática. Por isso se observa que na prática, a produção de etanol tende a diminuir a um pH igual ou menor do que o pKa 4,75 do ácido acético e a levedura, nesta pesquisa, aparentemente manteve um equilíbrio em torno deste pH para que seu metabolismo celular não fosse afetado (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; NUGROHO; YOSHIKAWA; SHIMIZU, 2015).

### 5.3.2 Produção de Bioetanol

A Figura 29 mostra a produção de bioetanol em relação ao tempo de fermentação e ao substrato adicionado ao meio de cultura utilizado (MS: Meio Sintético; HD: Hidrolisado Detoxificado; HB: Hidrolisado Bruto sem Detoxificação), ambos com concentração inicial de açúcar redutor de 50 g L<sup>-1</sup>. Verificou-se que para os pHs e meios nas fermentações obteve-se produções apreciáveis de etanol, o que poderia indicar que a levedura sofreu pouco estresse e conseguiu converter com eficiência açúcares redutores em bioetanol. Observa-se que os valores máximos foram de 23,65 g L<sup>-1</sup> para o hidrolisado bruto em pH 6,5 após 24 horas de fermentação, e o mínimo 13,42 g L<sup>-1</sup> obtido para o meio sintético em pH 5,5. Com os resultados mostrados na Figura 29 é possível notar que o processo de detoxificação com carvão ativado aplicado nos hidrolisados de resíduos de mandioca não se fez necessário quando se procedeu a fermentação com a levedura *S. cerevisiae*, visto que mesmo na presença de compostos fenólicos no hidrolisado bruto, houve maior produção de bioetanol em todos os pHs quando comparado à produção nas mesmas condições utilizando o meio detoxificado, ou seja, indicando que não houve inibição significativa da atividade microbiana, o que seria uma etapa a menos a ser realizada na produção de etanol a partir desta biomassa, e economicamente mais viável a nível industrial. Apesar de a produção de bioetanol ter sido maior depois de decorridas 24 horas de fermentação (23,65 g L<sup>-1</sup>), foi observada a mais baixa taxa de produtividade (0,98 g L h<sup>-1</sup>). Em contraste, a mais alta produtividade foi conseguida nas primeiras 8 horas de fermentação em pH 6,5 (2,8 g L h<sup>-1</sup>). Estes resultados apresentaram

mais do que o dobro de produtividade ( $1,2-1,3 \text{ g L h}^{-1}$ ) obtida por outro estudo realizado por Moshi et al. (2015a), onde estes utilizaram tratamento enzimático combinado com álcali em cascas de mandioca para produção simultânea de bioetanol e biogás utilizando a mesma levedura.

**Figura 29** – Produção de bioetanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 em Meio Sintético-MS, Hidrolisado Bruto-HB e Hidrolisado Detoxificado-HD, nos tempos de 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas incubados a 30°C.



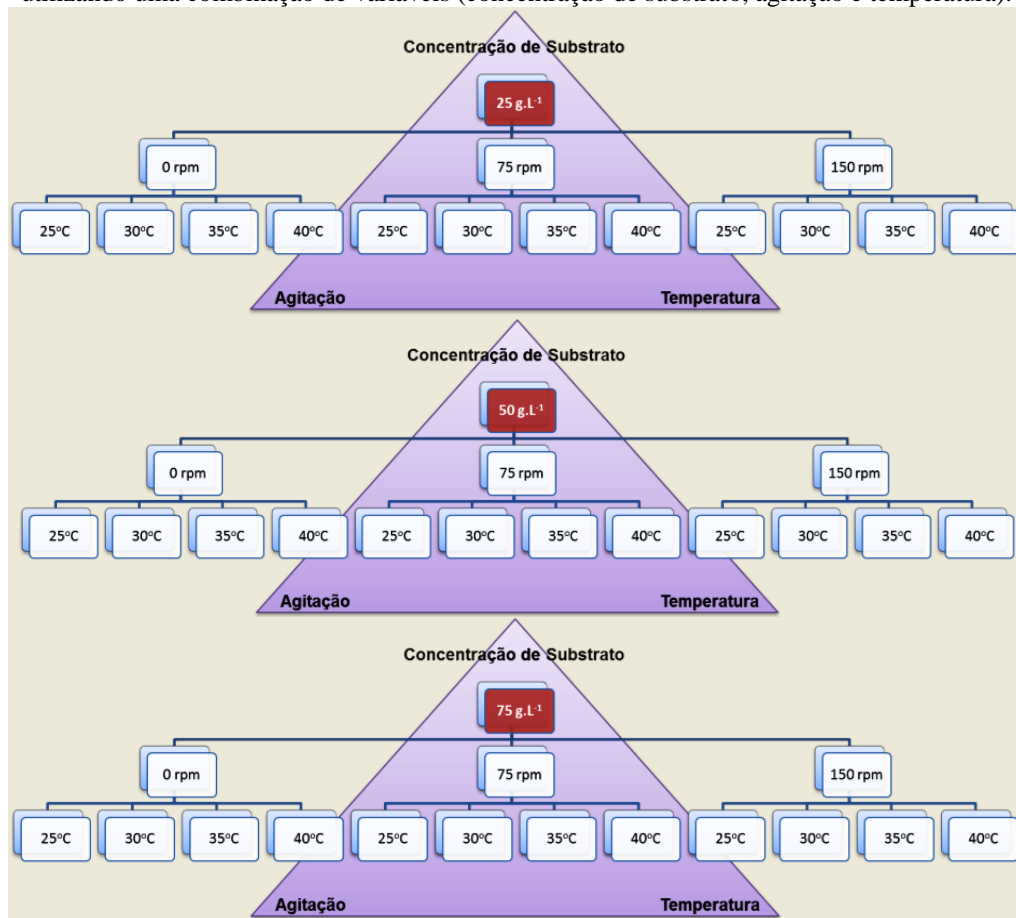
A *S. cerevisiae* pode converter o furfural para álcool furfúrico e HMF para 2,5-bis-hidroximetilfurano, portanto estes compostos oferecem apenas uma ligeira inibição no crescimento da levedura (PALMQVIST; ALMEIDA; HAHN-HÄGERDAL, 1999). Já o ácido 4-hidroxibenzóico e aldeído coniferílico (compostos fenólicos), muito encontrados em hidrolisados de madeira, são potenciais inibidores já relatados na fermentação com *S. cerevisiae*. Como os resíduos de mandioca são pobres em lignina, houve a liberação de baixa quantidade de compostos fenólicos na etapa da hidrólise ácida e a inibição de fato foi menos efetiva frente ao microrganismo. Além disso, a literatura aborda que baixas concentrações de ácidos no meio até levam a um efeito estimulante sobre a produção de etanol por *S. cerevisiae* (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989) e que ainda este microrganismo pode converter alguns inibidores fenólicos em compostos menos tóxicos, por exemplo, aldeído coniferílico que é reduzido ao álcool coniferílico e ao álcool dihidroconiferílico (JÖNSSON et al., 1998). Esta abordagem da literatura pode explicar o fato pelo qual, neste trabalho, a levedura

conseguiu uma maior produção de etanol no HB (Hidrolisado Bruto) do que no HD (Hidrolisado Detoxificado), conforme mostra a Figura 29. Portanto, para as demais fermentações a etapa de detoxificação dos hidrolisados foi desconsiderada, o que elimina custos e tempo no processo operacional. Ainda com a finalidade de otimizar o processo de produção de bioetanol utilizando resíduos de mandioca, o tempo das fermentações foi reduzido para 12 horas, fixou-se um pH 6,5 para todas as demais fermentações realizadas, no qual se obteve melhores rendimentos em etanol (Figura 29). A inibição que compostos tóxicos causam ao crescimento microbiano dependerá da quantidade dos mesmos no meio de cultivo utilizado e também do tipo do microrganismo empregado (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000), sendo que as bactérias demonstram maior sensibilidade a tais compostos em relação ao crescimento celular (HODGE et al., 2009). No presente trabalho esta inibição não ocorreu visto que a levedura *Saccharomyces* apresenta-se pouco sensível a estes compostos, uma vez que a produção de etanol no Hidrolisado Bruto foi maior que a do Hidrolisado Detoxificado.

#### **5.4 Fermentações Sucessivas**

Após a fermentação prévia (com duração de 24 horas), foram realizados testes com dois meios de cultura contendo: o Hidrolisado Bruto, que se apresentou como o melhor substrato para a produção de etanol e o Meio Sintético (com adição de glicose). As condições testadas foram: concentração inicial de açúcares redutores ( $25 \text{ g L}^{-1}$ ,  $50 \text{ g L}^{-1}$ ,  $75 \text{ g L}^{-1}$ ), temperatura ( $25^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $35^{\circ}\text{C}$  e  $40^{\circ}\text{C}$ ) e agitação do meio (0 rpm, 75 rpm e 150 rpm) conforme a Figura 30. Foram retiradas alíquotas para análises nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação.

**Figura 30** – Esquema mostrando o passo-a-passo simplificado dos 72 processos fermentativos (36 fermentações para HB; 36 fermentações para MS) realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 utilizando uma combinação de variáveis (concentração de substrato, agitação e temperatura).



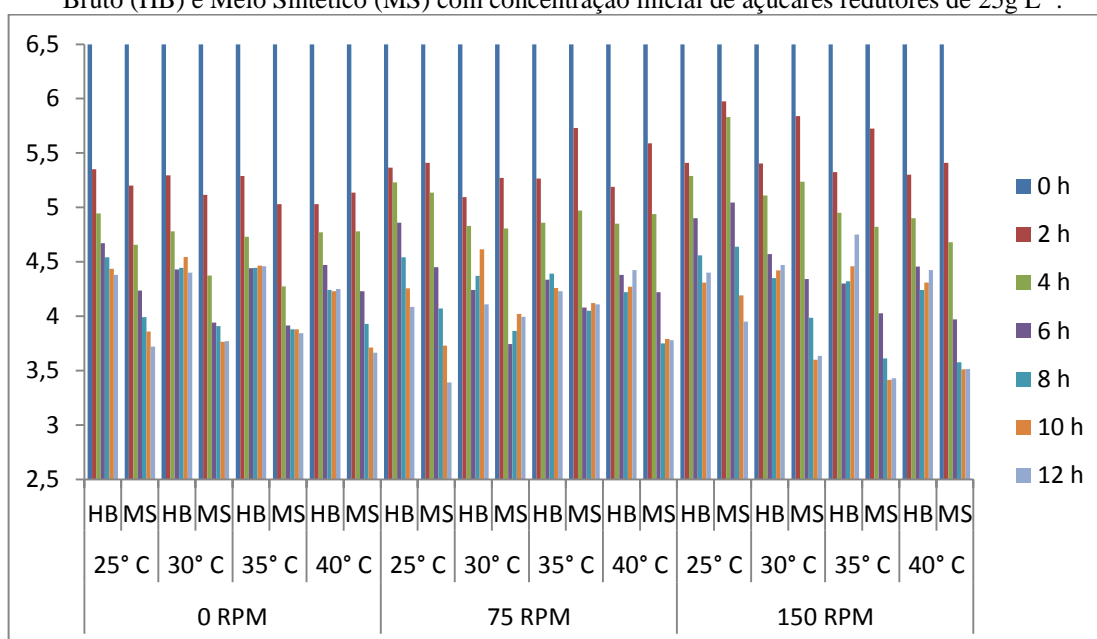
A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura amplamente utilizada na produção de etanol a partir de hexoses (glicose, em particular). Este cultivo é afetado pelas condições de processamento, incluindo a composição nutricional do meio de crescimento, o perfil da cultura, o pH do meio, o tamanho do inóculo e do tipo de cepa. Nota-se que, devido ao grande número de variáveis de processamento, um grande número de experimentos foram necessários para determinar as condições ótimas de cultivo.

#### 5.4.1 pH

Ambos os meios de cultivo utilizados nas fermentações sucessivas de 12 horas tiveram o pH inicial de 6,5. As Figuras 31, 32 e 33 mostram a redução do pH conforme se transcorre o tempo de fermentação. É possível observar que ambas as amostras contendo os Hidrolisados Brutos apresentaram pH final maior do que o pH final dos Meios Sintéticos. Nos experimentos realizados com concentração de AR 25g L<sup>-1</sup>, a média do pH no final das

fermentações se manteve próximo a 4,36 para HB e 3,73 para MS (Figura 31). Quando se partiu de uma condição diferente de AR de 50g L<sup>-1</sup>, o pH global final foi de 4,5 para HB e 3,37 para MS (Figura 32). Por último, na concentração de AR 75g L<sup>-1</sup> o pH final foi de 4,6 no HB e 3,30 no MS (Figura 33). É possível se observar que, mesmo triplicando a concentração de açúcares fermentescíveis oferecidos não ocorre uma variação brusca nos pHs. Isto demonstra que as células de levedura podem ajustar seu metabolismo de forma eficiente (KARAPATSIA et al., 2016).

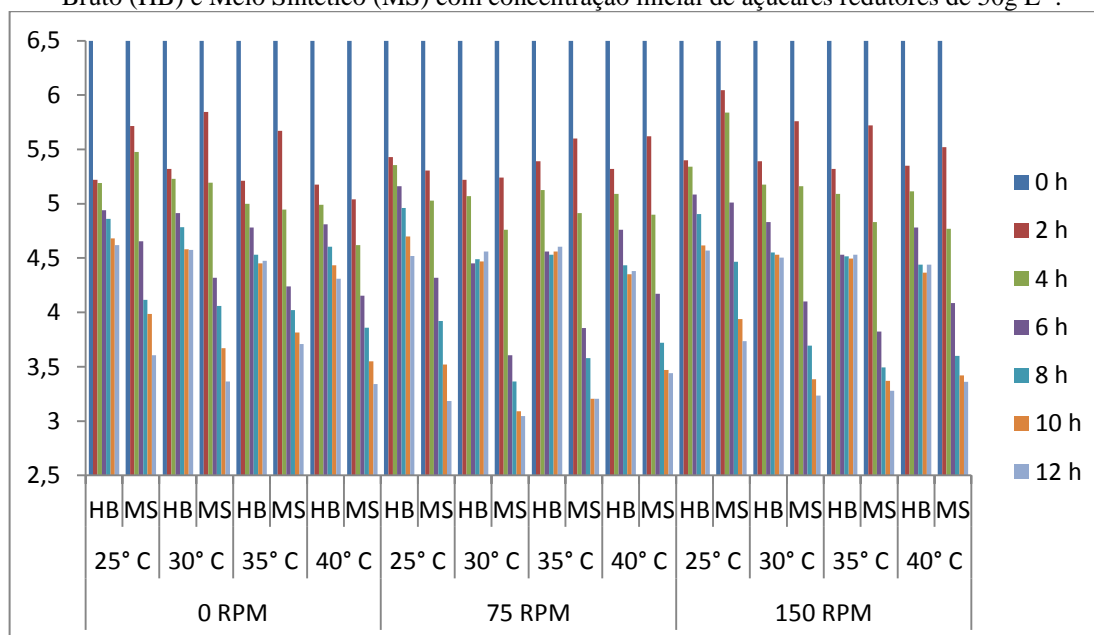
**Figura 31** - Variação de pH durante as fermentações realizadas com meios de cultivo contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) com concentração inicial de açúcares redutores de 25g L<sup>-1</sup>.



Karapatsia et al. (2016) também verificaram que o o pH do meio de cultura foi o segundo fator mais importante a ser controlado durante a fermentação. Uma vez que, geralmente, as células de levedura podem ajustar seu metabolismo e um aumento no pH 4 para 5,75 foi seguido por aumento da concentração de etanol. Entretanto, um aumento mais pronunciado para pH 7 reduziu a taxa de produção de etanol.



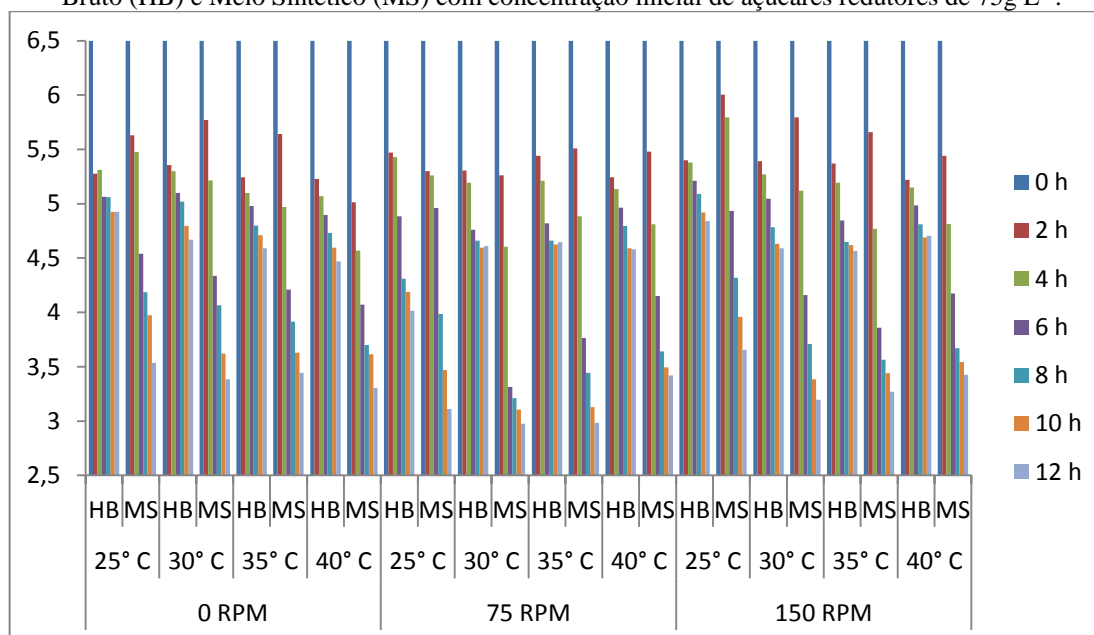
**Figura 32** - Variação de pH durante as fermentações realizadas com meios de cultivo contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) com concentração inicial de açúcares redutores de 50g L<sup>-1</sup>.



Palmqvist et al. (1998) realizaram fermentação com *S. cerevisiae* a partir de hidrolisado de madeira de pinheiro (concentração celular de 0,8 g L<sup>-1</sup>) e verificaram que não ocorreu crescimento durante 17h a pH 4,6. Um ajuste do pH 4,6-5,0 foi capaz de iniciar a replicação celular, e aumentou a produtividade de etanol para 0,17 g L<sup>-1</sup> no referido estudo.

O pH exerce influência no crescimento celular em hidrolisados lignocelulósicos devido à presença de ácidos fracos (por exemplo, o ácido acético, fórmico e levulínico com pKa 4,75, 3,75, e 4,66, respectivamente) não dissociados a pH baixo, que tornam-se lipossolúveis e podem atravessar membranas biológicas, gerando estresse ácido ao microrganismo e a produção de etanol pode ser afetada. A gama de pH ótimo para o crescimento de *S. cerevisiae* é em pH 5,0-5,5, e o crescimento tem sido detectado a um pH tão baixo quanto 2,5 na ausência de ácido acético em fermentações modelo (meios com adição de glicose), enquanto que o pH mínimo de crescimento foi em torno do pH 4,5 em hidrolisados na presença de ácido acético (10g L<sup>-1</sup>) (PALMQVIST, HAHN-HÄGERDAL, 2000). Em nosso estudo, foi possível observar que o pH após 12 horas de fermentação para o HB ficou entre pH 4,3 e 4,6, valores próximos aos relatados pelos autores acima, mostrando que a levedura é capaz de crescer bem no hidrolisado ácido de resíduo de mandioca. Nos Meios Sintéticos onde apenas se adicionou glicose, conseqüentemente não ocorreu acúmulo acentuado de ácidos, pois não houve a etapa de hidrólise prévia como aplicado aos resíduos lignocelulósicos para liberação de açúcares, o pH final das fermentações foi mais baixo (em torno de pH 3 a 3,7).

**Figura 33** - Variação de pH durante as fermentações realizadas com meios de cultivo contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) com concentração inicial de açúcares redutores de 75g L<sup>-1</sup>.

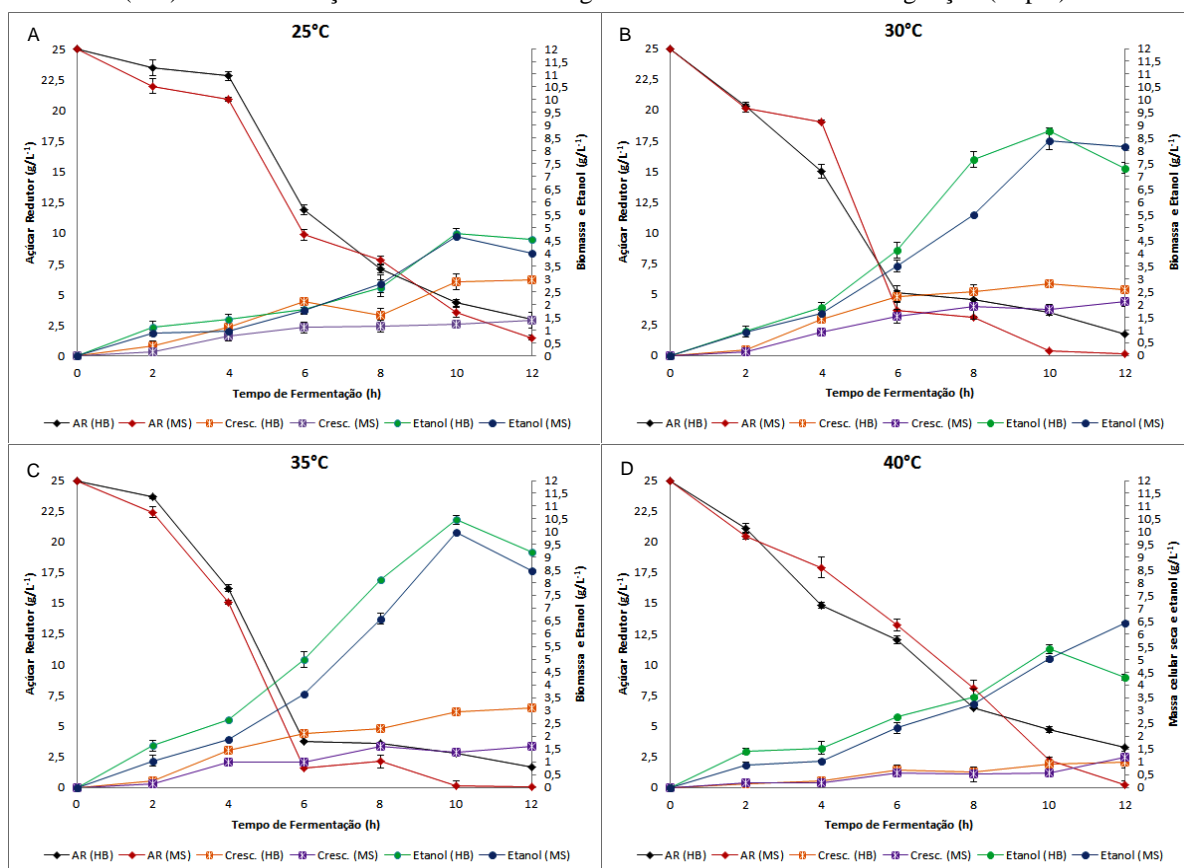


#### 5.4.2 Crescimento celular, produção de etanol e consumo de açúcares redutores pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602.

O inóculo inicial de cada fermentação foi de 0,18g. A Figura 34 mostra os resultados obtidos nas sucessivas fermentações de 12 horas utilizando o meio contendo Hidrolisado Bruto e Meio Sintético com concentração inicial de açúcares redutores de 25 g L<sup>-1</sup>, e ambos os experimentos foram mantidos em estado estacionário. Pode se observar que conforme transcorrido o tempo de incubação da levedura, ocorreu um incremento na biomassa tanto para o Meio Sintético (MS) quanto para o meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) nos parâmetros testados. O aumento de biomassa no geral foi maior neste último do que no MS em ambas as temperaturas, sendo que o maior e menor crescimento celular no HB ocorreu nas temperaturas de 35 e 40 °C (3,11 g e 0,98 g), respectivamente (Figura 34 C e D). Já o maior e menor crescimento celular no MS ocorreu nas temperaturas de 30°C e 40°C (2,10 g e 1,19 g), respectivamente (Figura 34 B e D). Ainda em relação à figura 34, nota-se a produção de bioetanol em relação ao tempo de fermentação e o meio utilizado. Os valores máximos de etanol obtidos foram de 10,46 g L<sup>-1</sup> para o HB e 9,97 g L<sup>-1</sup> para o MS em 10 horas de fermentação ambos em temperatura de 35°C (Figura 34 C). Já os valores mais baixos de etanol em 10 horas de fermentação foram constatados na temperatura de 25°C (Figura 34 A) para o meio contendo Hidrolisado Bruto e Meio Sintético, respectivamente (4,79 g L<sup>-1</sup> e 4,67 g L<sup>-1</sup>). Houve um rápido decréscimo dos açúcares presentes nos meios de cultura durante as

primeiras 6 horas de fermentação no qual foi mais acentuado em 35°C (Figura 34 C), temperatura tal que ofereceu a melhor assimilação destes açúcares fermentescíveis pela levedura, o que foi confirmado pelo rápido aumento inversamente proporcional dos níveis de etanol produzidos no HB e MS. Em outras palavras, na condição de 35°C houve o mais rápido e efetivo consumo de açúcares dos meios (açúcares residuais ao fim da fermentação era de 1,70 g L<sup>-1</sup> no HB e 0,09 g L<sup>-1</sup> no MS) e concomitantemente maior foi a produção de etanol. Verifica-se, adicionalmente, que após 10 horas de fermentação a fonte de glicose já se encontrava praticamente esgotada em ambos os meios fermentativos, consequentemente, a escassez desta fonte de seis carbonos levou à levedura a utilizar o próprio produto do metabolismo secundário (etanol), ocasionando um ligeiro decréscimo nos níveis de etanol como pode ser visto ao final da fermentação (Figura 34 C). Baixas concentrações de substrato para a produção de bioetanol por *Saccharomyces ATCC 26602* são desejadas, já que não ocorrem perdas de fonte de carbono para a produção de subprodutos (glicerol) e é possível uma melhor eficiência de conversão do açúcar em produto final e menor quantidade de açúcar residual.

**Figura 34** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae ATCC 26602* no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 25g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sem agitação (0 rpm).

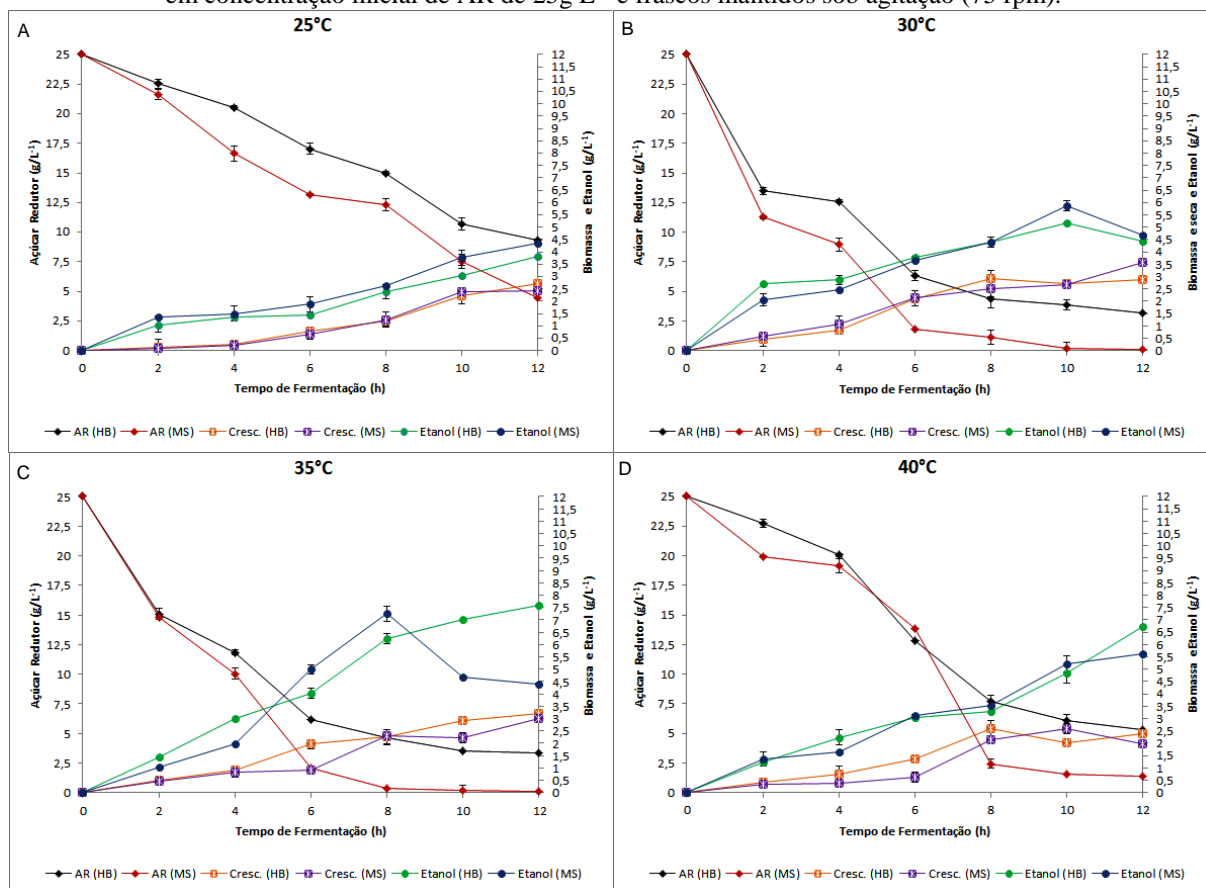


Moshi et al. (2015 b) realizaram a produção de bioetanol a partir de mandioca selvagem e conseguiram níveis de etanol próximos a 10-11% (v/v), e a elevada eficiência de conversão dos açúcares presentes na matéria-prima (97,6%) foi alcançada por hidrólise separada do processo de fermentação e sacarificação simultânea. O amido é uma matéria-prima de alto rendimento para a produção de bioetanol, mas a sua hidrólise é necessária na liberação dos açúcares fermentescíveis. Neste trabalho os autores partiram de uma hidrólise enzimática com  $\alpha$ -amilase e glucoamilase e conseguiram concentração de 250 g L<sup>-1</sup> em açúcares redutores que posteriormente foram utilizados como substrato para fermentação por *S. cerevisiae* incubada a 30°C, e a maior concentração de etanol obtida foi de 84g L<sup>-1</sup>. Tais valores são superiores ao máximo obtido na presente pesquisa, onde as melhores condições de hidrólise ácida foi capaz de liberar 134,84 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores, visto que hidrólise com enzimas é mais específica e libera maior quantidade de açúcares, porém se torna um processo mais caro e demorado. À temperatura de 35°C utilizando a mesma levedura e uma concentração inicial de 25 g L<sup>-1</sup>, ou seja, dez vezes menor do que a concentração de AR dos referidos autores, foram conseguidos 10,46 g L<sup>-1</sup> de etanol em 10 horas de fermentação, o correspondente a 92,3% do rendimento teórico máximo, valores muito próximos aos relatados pelos autores Moshi et al. (2015 b). Ou seja, uma menor concentração inicial de substrato pode proporcionar bons rendimentos em etanol, e isso pode ser explicado pelo fato de que meios altamente concentrados em açúcares podem desencadear inibição osmótica microbiana e com isso prejudicar a produção de bioetanol. Ainda em relação ao trabalho destes autores, as melhores condições para sacarificação e fermentação simultânea foram a liberação de 168,7 g L<sup>-1</sup> AR e produção de etanol de 84,3 g L<sup>-1</sup> com tempo de processamento de 16 horas, ou seja, um rendimento de 97% e produtividade de até 6,5 g L h<sup>-1</sup> foi observada. O pH foi monitorado em 4,7-5,5, no qual era bom para ambas as glicoamilases e a levedura, e este processo rendeu alta eficiência e produtividade, uma vez que a pressão osmótica não poderia impor inibição para as células de levedura. Tais resultados são próximos aos do presente estudo, ressaltando que os autores utilizaram diretamente a polpa de mandioca que possui maior quantidade de amido prontamente hidrolisável e conseqüentemente maior concentração de glicose para a fermentação, o tempo de fermentação foi mais prolongado e a acidez do meio de cultivo foi controlada em fermentador automatizado. Este conjunto de fatores pode explicar o rendimento ligeiramente maior em etanol que foi conseguido (97%) e altas produtividades (6,5 g L h<sup>-1</sup>), quando comparado à produtividade da Figura 34 C que correspondeu a 1,04 g L h<sup>-1</sup>.

A Figura 35 mostra os resultados obtidos nas fermentações utilizando o meio contendo HB e MS com a mesma concentração de açúcares redutores ( $25 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizada anteriormente, porém os ensaios foram submetidos à agitação média de 75 rpm em *shaker* com temperatura controlada. Nesta Figura 35 pode se observar que conforme transcorrido o tempo de incubação da levedura, ocorreu um incremento na biomassa tanto para o Meio Sintético (MS) quanto para o meio contendo Hidrolisado Bruto (HB). O aumento de biomassa foi aparentemente similar nos dois meios em A e B, e ligeiramente superior no HB em C e D. O maior crescimento celular no HB ocorreu na temperatura de  $35^\circ\text{C}$  ( $3,20 \text{ g}$ ) podendo ser observado na Figura 35 C. Já o maior crescimento celular no MS ocorreu na temperatura de  $30^\circ\text{C}$  ( $3,56 \text{ g}$ ) (Figura 35 B). No quesito produção de etanol, observou-se que os valores máximos foram de  $7,57 \text{ g L}^{-1}$  para o HB em 12 horas de fermentação e  $7,24 \text{ g L}^{-1}$  para o MS em 8 horas de fermentação ambos em temperatura de  $35^\circ\text{C}$  (Figura 35 C), a mesma temperatura ótima observada na figura anterior (Figura 34 C). A inserção de agitação branda no processo (75 rpm) pode ter favorecido o aumento da biomassa, porém não foi efetiva para a produção de etanol, que foi 27,62% inferior no HB em comparação ao máximo etanol conseguido utilizando este mesmo meio, mesma concentração de açúcares redutores e mesma temperatura, porém com ausência de agitação nos frascos; e 27,38% menor no MS às mesmas condições aplicadas (Figura 34 C e Figura 35 C).

Já a pior condição observada na Figura 35 onde se obteve baixa produção de etanol em 12 horas de fermentação ( $3,80 \text{ g L}^{-1}$  HB;  $4,35 \text{ g L}^{-1}$  MS) foram constatados na temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Houve um lento consumo dos açúcares redutores presentes nos meios de cultura e ao final da fermentação ainda restava boa parte da fonte de carbono oferecida ao microrganismo ( $9,28 \text{ g L}^{-1}$  HB;  $4,46 \text{ g L}^{-1}$  MS) conforme pode ser verificado na Figura 35 A. Uma explicação para isto seria pelo fato de que a agitação favorece a aglomeração e crescimento do microrganismo por possibilitar maior aeração ao meio e disponibilidade de oxigênio para a levedura. Porém esta mesma agitação associada à temperatura de  $25^\circ\text{C}$  pode fazer com que esta diminua ainda mais, refrigerando o meio deixando uma condição de temperatura longe da ótima para o crescimento de *S. cerevisiae*, além do que a aglomeração pode prejudicar a produção do etanol por possibilitar menor difusão de nutrientes entre as células (OSTERGAARD et al., 2000).

**Figura 35** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 25g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sob agitação (75 rpm).



Lin et al. (2012) analisaram a influência da temperatura, concentração inicial de glicose (substrato) e pH na fermentação etanólica por *S. cerevisiae* e verificaram que a taxa específica de crescimento e a taxa de produção de etanol máxima foi entre 30 e 45°C. O máximo de conversão de açúcar em etanol a 30°C após 72 horas de incubação foi de 48,0%, 59,9%, 28,3%, 13,7% e 3,7% para 20, 40, 80, 160 e 300 g L<sup>-1</sup> de glicose, respectivamente. Observou-se que um aumento da oferta de substrato não melhorou a taxa específica de produção de etanol, principalmente quando o valor de pH não foi controlado, onde um pH 4,0-5,0 se mostrou como o intervalo ótimo para o processo de produção de etanol (61,93% do rendimento teórico). O mesmo ocorreu no presente trabalho, onde a temperatura ótima para a produção de etanol no hidrolisado de resíduos de mandioca foi de 35°C, valor intermediário ao relatado pelo autor, e também foi verificado que quanto maior a concentração inicial de substrato, menor foi a conversão do açúcar, ou seja, uma maior oferta de substrato não culminou na maior produção de etanol, como pode ser observado nas Figuras 40, 41 e 42, por exemplo.

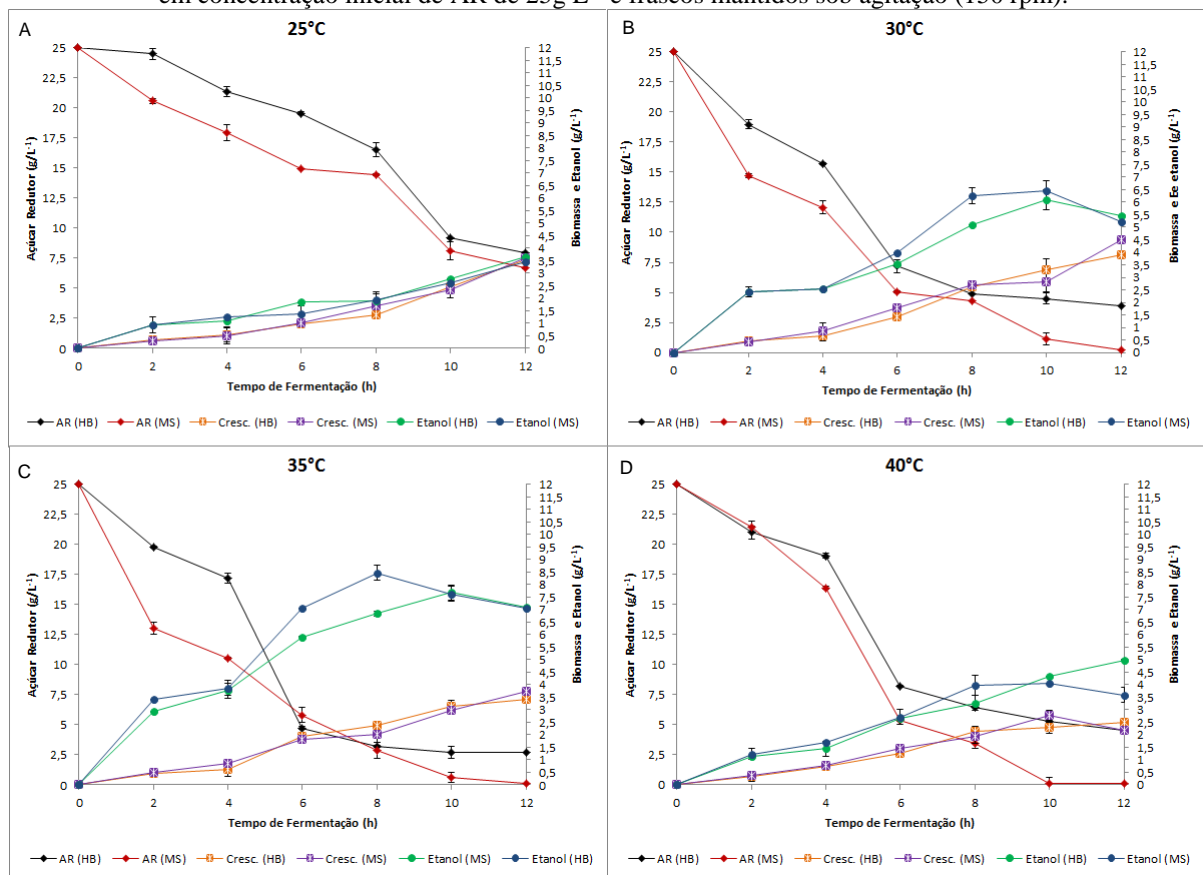
Os resultados da Figura 36 fazem relação ao tempo de fermentação, crescimento celular e produção de etanol para os testes realizados com a mesma concentração inicial de AR descrita anteriormente e os reatores foram mantidos sob agitação vigorosa de 150 rpm. Ocorreu um aumento na biomassa semelhante para os dois meios de cultura (meio contendo o hidrolisado bruto e meio sintético) nas quatro temperaturas testadas (Figura 36 A, B, C e D). A maior multiplicação da levedura se deu na temperatura de 30°C (3,90 g HB; 4,5 g MS, ver Figura 36 B), o que correspondeu a um aumento de 21,87% e 26,40% no crescimento celular levando em conta as melhores condições de crescimento selecionadas previamente (Figura 35 C). Pode-se observar que a agitação favoreceu o crescimento celular, ou seja, conforme se aumenta a velocidade de agitação dos frascos, mais acentuado se torna o incremento da biomassa leveduriforme no meio. Em contrapartida, um processo onde se tenha a conversão de fontes de carbono voltadas principalmente para manutenção do crescimento celular do microrganismo pode não ser vantajoso, pois além da grande quantidade de biomassa formada, a concentração de etanol nos meios não aumentou de forma proporcional ao crescimento. Isso pode ser explicado pelo fato de que a levedura não só produz o etanol como produto do metabolismo microbiano, mas também outro metabólito (glicerol), no qual esta via pode estar sendo favorecida pela agitação.

Em relação à produção de etanol, observou-se que os valores máximos obtidos foram de 8,46 g L<sup>-1</sup> para o HB em 8 horas de fermentação e 7,67 g L<sup>-1</sup> para o MS em 10 horas de fermentação ambos em temperatura de 35°C (Figura 36 C). Tais dados reforçam que a temperatura ótima de atuação da levedura para obtenção dos maiores índices de etanol está em torno de 35°C. O pior desempenho nesta série de testes para a produção de etanol (3,63 g L<sup>-1</sup> HB; 3,45 g L<sup>-1</sup> MS) foi constatado na temperatura de 25°C, mostrando que a levedura não atua bem em tal temperatura nem em condições de ausência e muito menos ao promover agitação no cultivo, o que fortalece a importância da temperatura na manutenção do microrganismo e que, de fato, uma diminuição de 10°C da zona ótima de atuação da levedura faz com que ela perfaça sua pior performance fermentativa, com um lento consumo dos açúcares redutores presentes nos meios de cultura.

*S. cerevisiae* possui diferentes fases de crescimento e durante a primeira fase exponencial ou fase fermentativa, a fermentação da glicose é a única via energética usada pela célula e a taxa de crescimento é alta. Em leveduras, a presença de glicose reprime a expressão dos genes que codificam enzimas da via respiratória, assim como genes que codificam enzimas envolvidas no catabolismo de outras fontes de carbono. Quando a glicose é

totalmente consumida, o ciclo celular é interrompido e genes envolvidos na via aeróbica do metabolismo são induzidos. Essa fase do crescimento é conhecida como segunda fase exponencial ou fase respiratória. Durante esta fase, a célula usa outras fontes de carbono para gerar energia. O etanol, principal produto da fase fermentativa, serve como importante fonte de carbono para as células na fase respiratória. Durante a fase respiratória, ao contrário da fase fermentativa, a célula depende de oxigênio e a produção de radicais livres é aumentada, o que pode explicar o motivo do declínio de etanol ao longo da fermentação e morte celular por acúmulo de metabólitos conforme mostra a Figura 36 D (CARLSON, 1999). As leveduras podem realizar além da fermentação o metabolismo respiratório, o qual exige a presença de oxigênio. O metabolismo respiratório apresenta um maior rendimento em ATP, quando comparado ao metabolismo fermentativo, e produz precursores de aminoácidos essenciais ao crescimento celular (WALKER, 1998). Neste trabalho, isto poderia explicar o fato de que as fermentações precedidas em agitação favoreceram o crescimento celular provavelmente devido à maior aeração e disponibilidade de oxigênio no meio (Figura 36).

**Figura 36** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 25g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sob agitação (150 rpm).





A Figura 37 apresenta os resultados obtidos nos experimentos fermentativos utilizando o meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração de açúcares redutores de  $50 \text{ g L}^{-1}$ , o dobro da concentração inicial utilizada nos ensaios anteriores, e ambas as fermentações desta série foram mantidas em estado estacionário. Nota-se que houve um aumento na biomassa ao longo das 12 horas de fermentação para todos os testes, porém este acréscimo não foi tão acentuado quanto dos experimentos onde se promoveu agitação ao meio. Adicionalmente, em temperaturas mais elevadas, no caso do presente trabalho que foram executados testes a  $40^\circ\text{C}$ , geralmente tem sido observado o menor crescimento celular que foi de  $1,37 \text{ g}$  no HB e  $1,31 \text{ g}$  no MS (Figura 37 D) e o maior crescimento celular foi observado na temperatura de  $30^\circ\text{C}$  ( $3,43 \text{ g}$  no HB e  $2,89 \text{ g}$  no MS, Figura 37 B), valores estes que corresponderam pelo menos ao dobro do crescimento conseguido ao se comparar a cinética de crescimento celular em temperatura mais elevada (Figura 37 D). A produção de etanol para estes experimentos de forma global não ultrapassou o patamar de  $10 \text{ g L}^{-1}$ , com uma produção média de  $7,58 \text{ g L}^{-1}$  de etanol, com exceção da Figura 37 C, onde vale destacar os níveis de etanol produzidos que chegaram a  $21,23 \text{ g L}^{-1}$  no HB e  $16,89 \text{ g L}^{-1}$  no MS, valores estes expressivos em relação ao demais experimentos da série. Embora nesta condição e temperatura de  $35^\circ\text{C}$  tenha-se obtido o melhor rendimento em etanol do presente trabalho que foi  $0,49 \text{ g/g}$  de glicose ( $96,5\%$ ) e que este valor é bastante promissor em relação ao máximo teórico descrito na literatura para hidrolisado lignocelulósico (Figura 37 C), observou-se que a cinética de consumo de açúcares foi mais lenta (ao final das fermentações um saldo remanescente de  $6,87 \text{ g L}^{-1}$  de AR no HB e  $0,93 \text{ g L}^{-1}$  no MS) em relação ao experimento da Figura 34 C, no qual o rendimento em etanol correspondeu a  $92,3\%$ , com praticamente a mínima concentração de açúcares residuais ao final do processo. Observa-se também que para as demais temperaturas esboçadas nos gráficos da Figura 37, tem-se quantidade apreciável de açúcares redutores não metabolizados pela levedura decorridas 12 horas da fermentação alcoólica ( $21,70 \text{ g L}^{-1}$  no HB e  $13,47 \text{ g L}^{-1}$  no MS, Figura 37 A; aproximadamente  $12,5 \text{ g L}^{-1}$  de AR finais para ambos os meios nos ensaios realizados em  $40^\circ\text{C}$ , Figura 37 D). Uma explicação para isso é que a levedura pode ter apresentado certa saturação dos nutrientes e até mesmo estresse osmótico frente a um meio com maior concentração de açúcares.

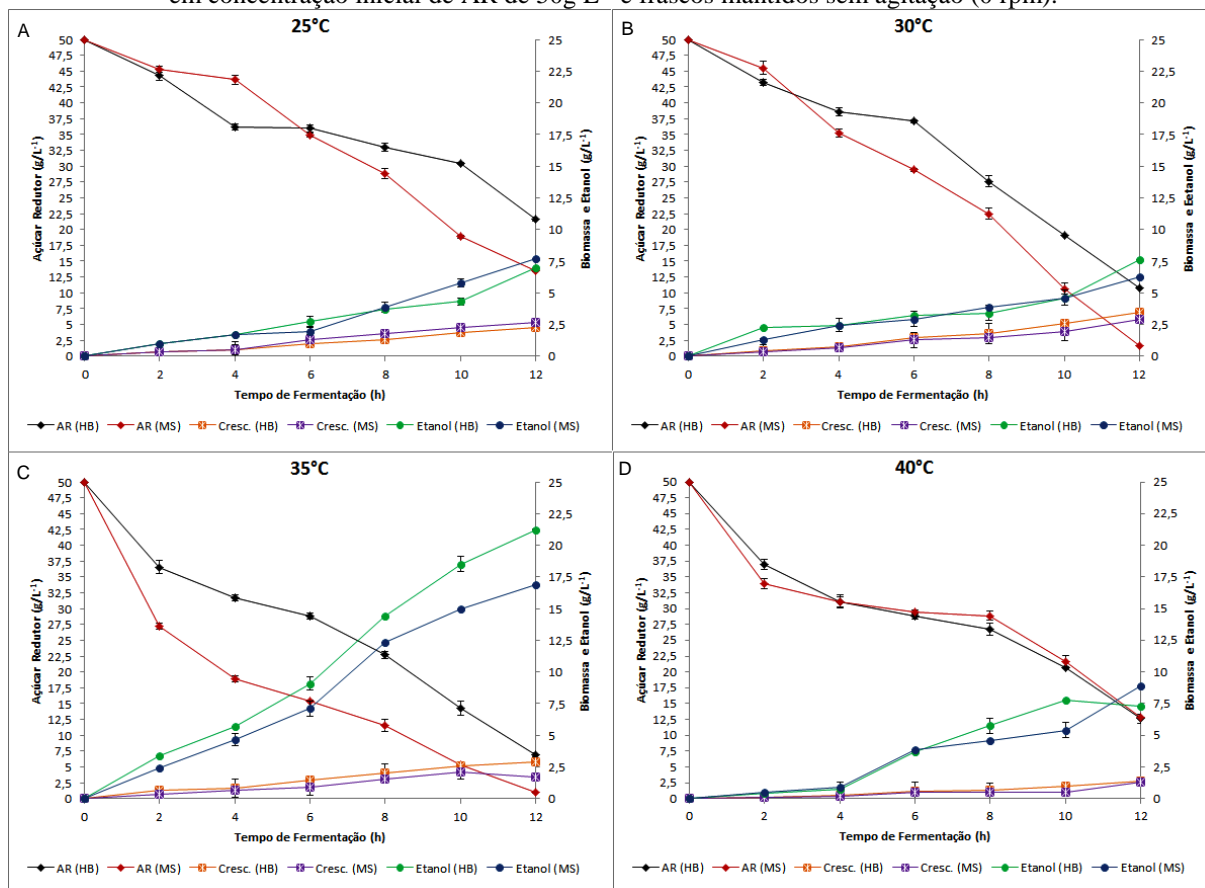
Behera et al. (2010) compararam a produção de bioetanol em *Saccharomyces cerevisiae* em hidrolisado de flor de marula. As condições utilizadas foram pH 6,5, temperatura de  $30^\circ\text{C}$  por 96 horas de fermentação. A produtividade apresentada nesse

trabalho foi de  $0,25 \text{ g L h}^{-1}$ , mostrando que foi menor que o obtido no presente trabalho. Esta diferença pode ser devido a quantidade de substrato utilizado aqui que foi o dobro trabalho citado.

Uma pesquisa de Moshi et al. (2014) objetivou a caracterização de espécies de mandioca não comestíveis (*Manihot glaziovii*) como matérias-primas para a produção de bioenergia. Estes autores constataram, por análises de composição química, que *M. glaziovii* foi adequada tanto para a produção de bioetanol e biogás, pois o teor de amido variou de 77% a 81% e os carboidratos estruturais em 3-16%. Após a fermentação obtiveram concentração de etanol de  $85 \text{ g L}^{-1}$ , com um rendimento teórico de 98%. Tais níveis de etanol foram compatíveis aos valores reportados em outro estudo no qual partiram de uma concentração inicial de AR semelhante ( $250 \text{ g L}^{-1}$ ) e foram conseguidos  $75,6 \text{ g L}^{-1}$  de etanol com eficiência de 97% (LIN et al., 2011). Ambas as pesquisas conseguiram melhores rendimentos em etanol do que os do presente estudo, possivelmente, pela aplicação de um processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF), que difere da hidrólise realizada como pré-tratamento separadamente ao processo de fermentação em estado submerso, onde no primeiro processo tem-se a liberação gradativa dos açúcares fermentescíveis do hidrolisado que são prontamente consumidos pela levedura, não havendo assim a interferência e inibição osmótica pelo substrato. Outra explicação para tais autores terem conseguido maiores volumes em etanol deve-se ao fato de que utilizaram diretamente a polpa dos tubérculos de mandioca, que é mais rica em carboidratos do que as cascas e resíduos em si utilizados nesta pesquisa.

A resposta celular ao estresse mais bem caracterizada em *S. cerevisiae* é a induzida por choque térmico. Quando células crescidas sob temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  são transferidas para  $40^{\circ}\text{C}$ , observa-se uma repressão geral na síntese de proteínas, simultaneamente, ocorre um acúmulo intracelular do dissacarídeo trealose e o aparecimento das proteínas de choque térmico (HSPs) que atuam como chaperoninas, auxiliando no correto enovelamento de proteínas (BECKER e CRAIG, 1994). Este fato pode explicar o motivo do crescimento celular ter sido menor quando as fermentações do presente estudo foram executadas em temperaturas mais elevadas (Figura 37 D), pois não houve adaptação/aclimatação prévia da levedura nos meios de cultura. É sabido que linhagens industriais de *S. cerevisiae* crescem bem a  $45^{\circ}\text{C}$  quando adaptadas gradativamente à temperaturas menores (BALLESTEROS et al, 1993).

**Figura 37** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 50g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sem agitação (0 rpm).



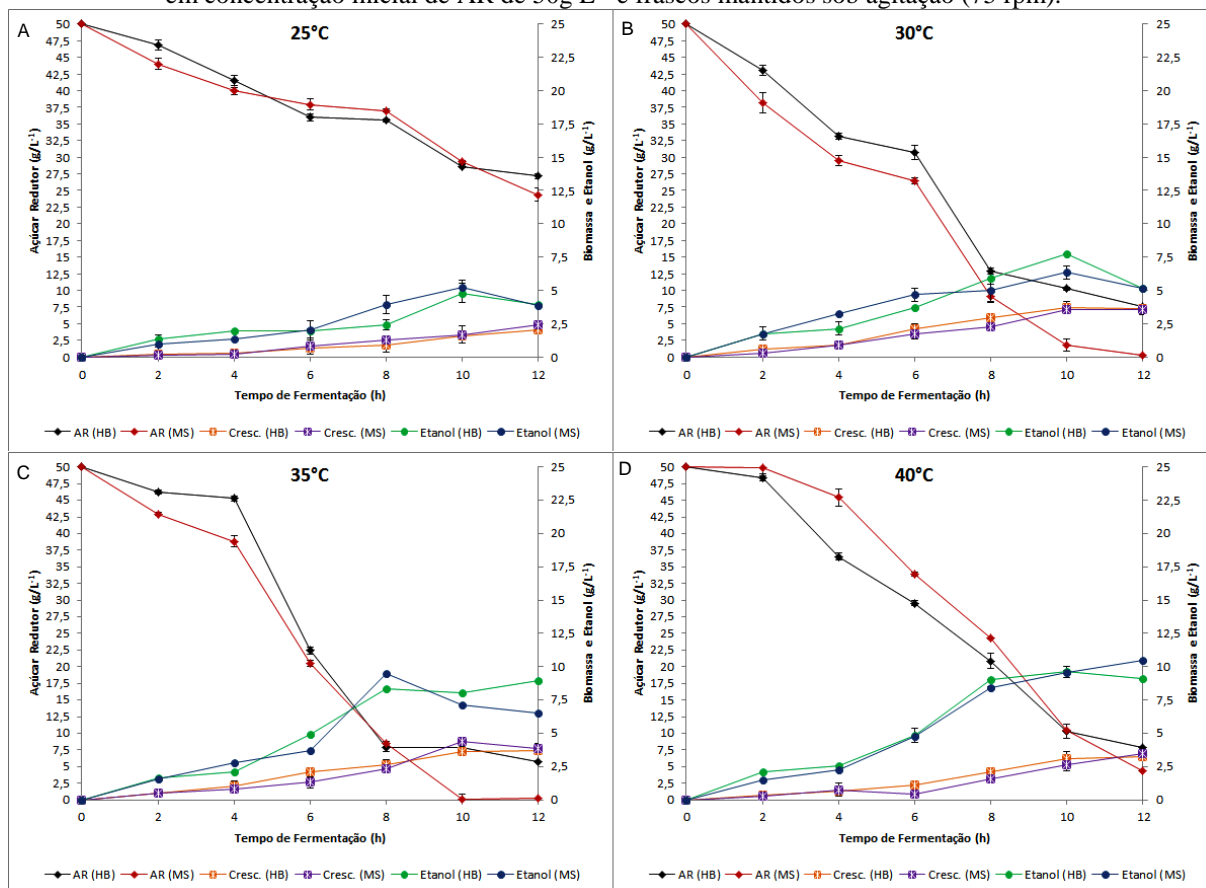
Os resultados da Figura 38 mostram o comportamento da levedura frente às condições em que foi submetida (concentração inicial de 50g L<sup>-1</sup> de AR; agitação de 75 rpm). Pode-se observar que para todas as quatro condições de temperatura aplicadas houve aumento similar na biomassa para ambos os meios de cultura (meio contendo Hidrolisado Bruto e Meio Sintético), conforme mostrado na Figura 38 A, B, C e D. O maior crescimento celular foi de 3,73 g para o HB e 4,36 g para o MS na temperatura de 35°C (durante as 12 e 10 horas de fermentação, respectivamente) conforme mostra a Figura 38 C, resultados próximos aos encontrados na figura 35 B, utilizando os mesmos parâmetros fermentativos, com exceção da concentração inicial de açúcar redutor que era mais baixo. Isso evidencia que ao se disponibilizar o dobro de açúcares fermentescíveis para conversão imediata destes em fonte de energia pela estirpe, não houve, necessariamente, um crescimento mais pronunciado do microrganismo.

O crescimento e a proliferação de microorganismos como as leveduras são controlados em parte pela disponibilidade de nutrientes. *Saccharomyces cerevisiae* tem a capacidade de crescer tanto por metabolismo anaeróbico ou aeróbico, dependendo da fonte de

carbono. Quando as células de levedura são crescidas em culturas líquidas em meios ricos em glicose, elas metabolizam este açúcar predominantemente pela glicólise, liberando etanol no meio. Quando a glicose torna-se limitante, ocorre uma diminuição da taxa de crescimento e metabolismo por comutação de glicólise aeróbia para utilização de etanol, e essa alteração do crescimento é conhecida como deslocamento diauxico. Quando o etanol é esgotado do meio e nenhuma outra fonte de carbono está disponível, as leveduras entram em uma fase estacionária que se caracteriza por mudanças específicas no ciclo celular, fisiológicas, bioquímicas e morfológicas, nas quais incluem espessamento da parede celular, acúmulo de carboidratos de reserva e aquisição de termotolerância (LAVOVÁ et al., 2014). Por este motivo que em alguns casos, como pode ser notado na Figura 37 C, logo nos períodos finais da fermentação se observa um decréscimo na quantidade de biomassa e etanol, o que provavelmente pode ser explicado pela escassez de nutrientes do meio, pela formação de produtos secundários que levam ao estresse celular, pela quantidade de compostos tóxicos presentes, mesmo que em menor quantidade e mesmo pelo comportamento da levedura em si (diauxia). Lavová e colaboradores (2014) constataram para duas cepas de *Saccharomyces* que a mudança diauxica ocorria após 8 a 12 horas de incubação.

Na produção de etanol, os valores máximos obtidos foram de 9,65 g L<sup>-1</sup> para o HB em 10 horas de fermentação e 10,51 g L<sup>-1</sup> para o MS em 12 horas de fermentação, desta vez ambos em temperatura de 40°C (Figura 38 D), tiveram um comportamento muito similar na produção de etanol observado na temperatura de 35°C (Figura 38 C), apresentando produções muito próximas de etanol. O pior desempenho nesta série de testes para a produção de etanol (5,23g L<sup>-1</sup> MS; 4,79g L<sup>-1</sup> HB) foi constatado na temperatura de 25°C (Figura 38 A), mostrando que a levedura atuou de forma ineficiente nesta dada condição térmica, a produção de etanol foi reduzida pela metade quando comparado às fermentações da Figura 38 C e D, e conseqüentemente, a maioria do açúcar redutor não foi convertido até o final da referida fermentação (Figura 38 A).

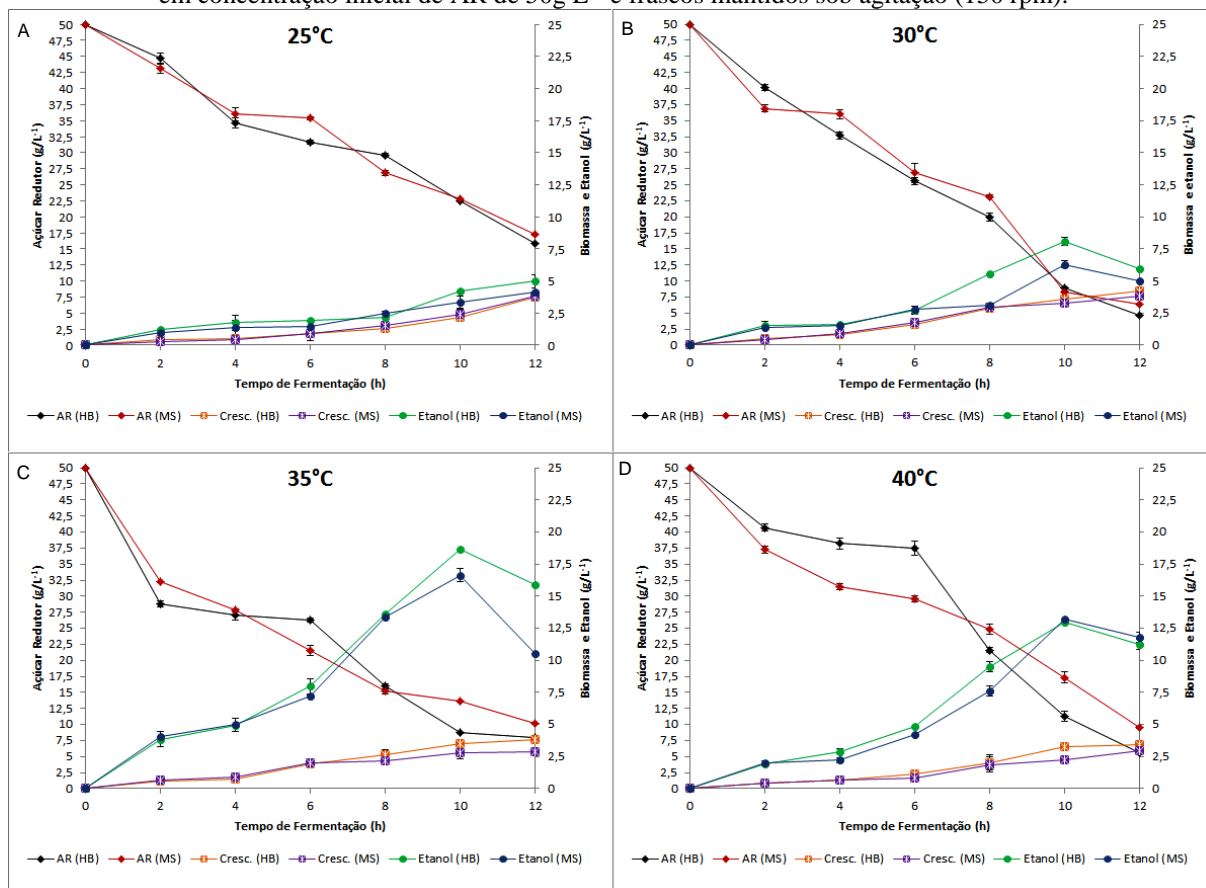
**Figura 38** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 50g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sob agitação (75 rpm).



A Figura 39 mostra o comportamento da levedura quando os meios de cultura continham inicialmente 50 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores e os frascos submetidos a agitação de 150 rpm. O crescimento do microrganismo manteve o mesmo padrão das fermentações anteriores, próximo para o HB e MS, não ultrapassando 5 g de biomassa ao final de cada fermentação. Vale destacar aqui a produção de etanol máxima que foi de 18,67 g L<sup>-1</sup> para o HB (rendimento de 88,6%, ou seja, 0,45g/g glicose) e 16,63 g L<sup>-1</sup> para o MS em apenas 10 horas de fermentação em 35°C. No entanto, este valor foi ligeiramente inferior ao encontrado na Figura 34 C (rendimento de 92,3%), onde as condições impostas foram: metade do teor de açúcar redutor inicial (25 g L<sup>-1</sup>) e o hidrolisado bruto não foi submetido à agitação mecânica. Tal resultado descrito nesta seção também foi inferior ao encontrado na Figura 37 C, utilizando a mesma concentração de AR, porém na ausência de agitação em que se obteve 96,5% de rendimento máximo em etanol. Fica claro que para aplicação industrial o processo mais vantajoso é aquele em que o custo-benefício é levado em conta, no caso do presente estudo a agitação mecânica estaria nada menos que agregando um custo desnecessário ao

processo, visto que a produção de etanol é praticamente a mesma quando o sistema de fermentação não necessita de tal ajuste.

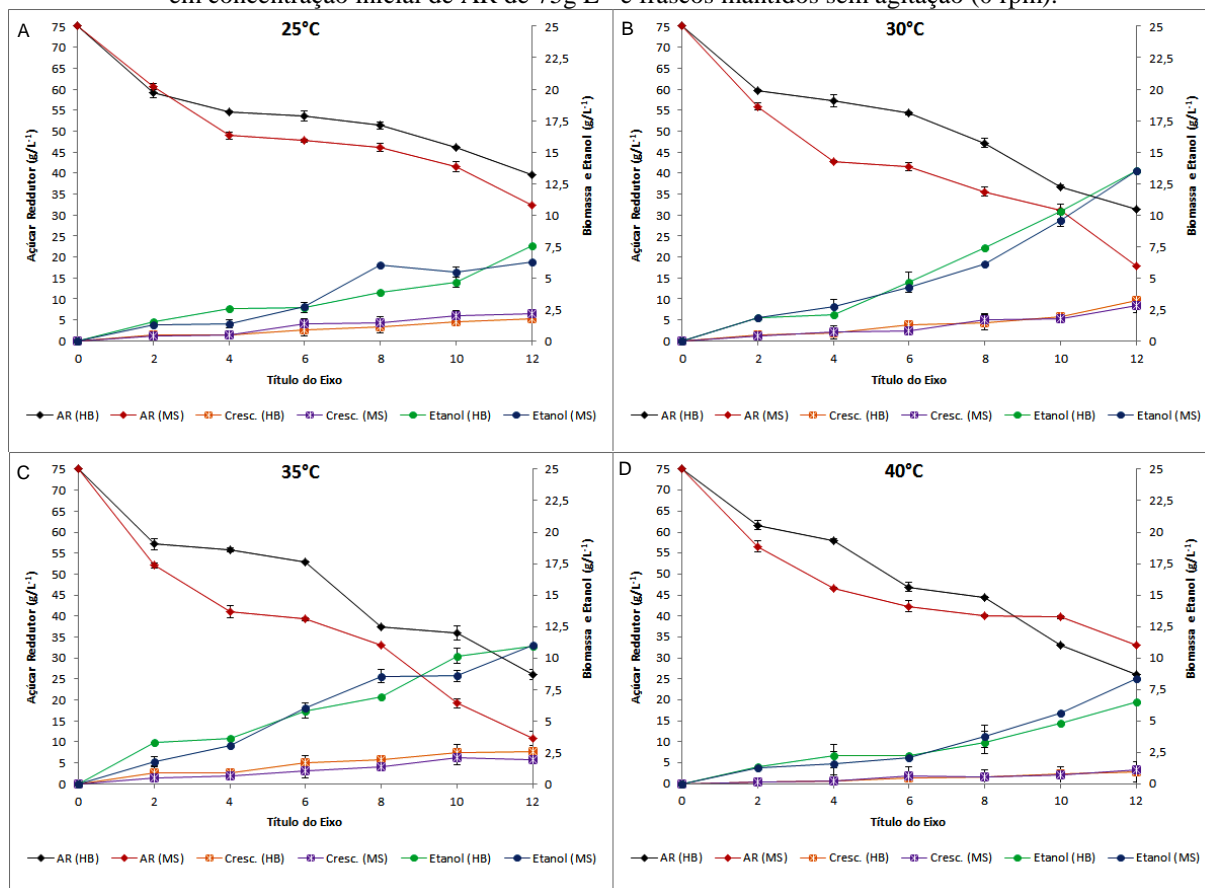
**Figura 39** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 50g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sob agitação (150 rpm).



Na figura 40 observa-se a produção de etanol, consumo de açúcares fermentescíveis e aumento de biomassa para as quatro temperaturas testadas. Porém, a concentração inicial de AR foi de três vezes superior ao aplicado para as primeiras fermentações, ou seja, 75 g L<sup>-1</sup>, portanto, meios altamente concentrados. Nota-se que esta adição de açúcar ao meio não apresentou diferença na produção de etanol, pelo contrário, meios muito concentrados em glicose prejudicaram o desempenho da levedura, muito provavelmente devido ao estresse osmótico sofrido pela mesma. A melhor produção de etanol ocorreu em temperatura de 30°C (aproximadamente 13,50 g L<sup>-1</sup> de etanol para ambos HB e MS), e o maior incremento de biomassa ocorreu também na mesma temperatura (3,23 g no meio contendo o Hidrolisado Bruto e 2,84 g no Meio Sintético) conforme a Figura 40 B.

Karapatsia e colaboradores (2016) realizaram um estudo e observaram que a condição operacional mais favorável relativa à produção fermentativa de etanol a partir de açúcares do hidrolisado de *Phalaris aquatica* foi incubação da levedura *S. cerevisiae* à 30°C e um crescimento de biomassa próximo a 3,5 g em 12 horas de fermentação. A concentração inicial de glicose foi ajustada em dois níveis (20 e 100 g L<sup>-1</sup>) representando uma baixa e uma elevada concentração, respectivamente, com a finalidade de quantificar o efeito de inibição pelo substrato. A partir da primeira concentração de açúcar, obteve-se 9,5 g L<sup>-1</sup> de etanol nas 10 horas fermentação, e em 6 horas já tinha ocorrido o consumo total da glicose. Já a partir da alta concentração inicial de glicose (100 g L<sup>-1</sup>) foram quantificados 23,54 g L<sup>-1</sup> de etanol. Uma comparação de desempenho do processo no primeiro e segundo experimentos realizados por estes autores demonstrou claramente o efeito inibidor da excessiva concentração inicial de glicose adicionada ao meio. Observaram também que o crescimento da cultura prosseguiu significativamente mais lento e a produção de etanol também foi afetada. Além disso, uma comparação do rendimento da glicose em etanol entre o primeiro (93,1%) e o segundo experimento (46,21%) mostrou que, quando o substrato é fornecido em excesso, o mecanismo de produção de etanol nas células é retardado devido ao *stress* osmótico, o que também pode ter acontecido no presente trabalho onde experimentos contendo uma concentração de açúcares inicial elevada, próxima à 75g L<sup>-1</sup>, não apresentou boa produção de etanol pelo mesmo motivo descrito (Figura 40, 41 e 42).

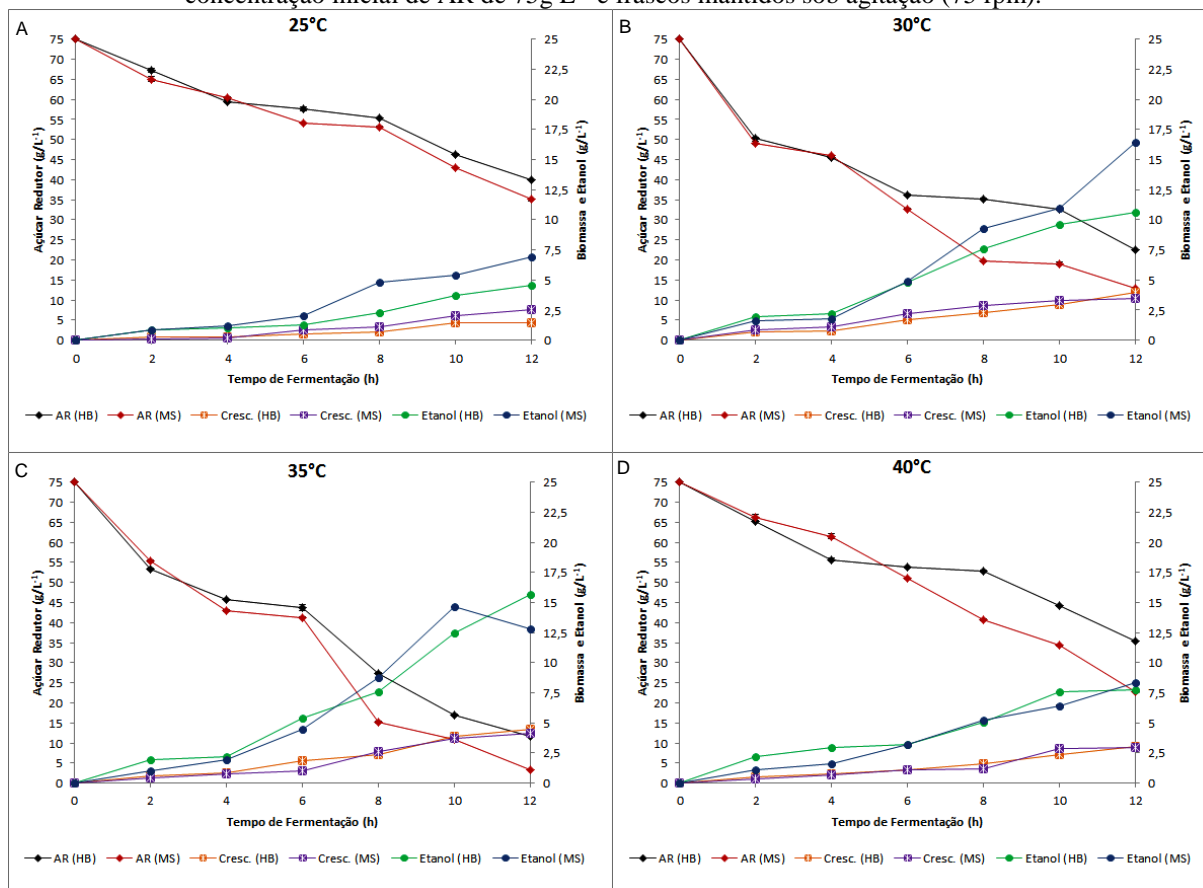
**Figura 40** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 75g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sem agitação (0 rpm).



Ao se incluir a agitação média de 75 rpm nos experimentos utilizando meios concentrados, a melhor condição de produção de etanol ocorreu em 35°C (Figura 41 C) com a obtenção de 15,70 g L<sup>-1</sup> para o HB e 14,64 g L<sup>-1</sup> para o MS, um incremento de apenas 16,2% e 8,4% na produção de etanol quando comparado à melhor condição de produção de etanol mostrado na Figura 40 B, não sendo viável aplicar uma etapa adicional que seria a agitação no processo para tão pouco aumento na produção de etanol. Todos estes valores estão muito abaixo do valor máximo teórico apontado pela literatura (0,51g/g de açúcar do meio) que deveria ser próximo à 38,25 g L<sup>-1</sup> de etanol a partir de um meio contendo 75 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores. Isto comprova mais uma vez que a maquinaria de conversão de glicose em etanol à nível microbiano envolve processos enzimáticos, e todo complexo enzima-substrato apresenta em algum momento certa saturação para a conversão do substrato em produto final, e conseqüente a produção de etanol chega em seu limite máximo.



**Figura 41** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de 75 g L<sup>-1</sup> e frascos mantidos sob agitação (75 rpm).



Virunanon et al. (2013) utilizaram polpa de mandioca isolada e suplementada com amido de mandioca proveniente de águas residuais (manipueira) como matéria-prima para a produção de bioetanol a partir de hidrólise enzimática com mix de enzimas ( $\alpha$ -amilases, glicoamilases e  $\beta$ -glucanases). Conseguiram liberação máxima de açúcares de 514.3 mg/g de amido hidrolisado em pH 6,5. A fermentação deste hidrolisado de polpa de mandioca usando *S. cerevisiae* (67 g L<sup>-1</sup>) produziu 8,8 g L<sup>-1</sup> de etanol, mas esta concentração de etanol foi aumentada para 12,9 g L<sup>-1</sup>, com a substituição de água por manipueira. Estes dados são paralelos aos do presente estudo, e devido à similaridade dos resíduos, as produções de etanol em concentrações de AR próximas (75 g L<sup>-1</sup>) renderam uma produção de etanol ligeiramente superior (~15 g L<sup>-1</sup>) conforme a Figura 41 C. Estes dados oferecem uma ideia de que a hidrólise enzimática aplicada em processos de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) para resíduos de mandioca não leva muita vantagem frente à hidrólise ácida, visto que esta última é mais barata, demanda um menor tempo, quer seja 10 minutos contra 24 horas de hidrólise enzimática utilizada pelo autor, e ao final a produção de etanol foi equivalente para ambos os processos. Adicionalmente, há o incômodo de que para cada enzima utilizada no

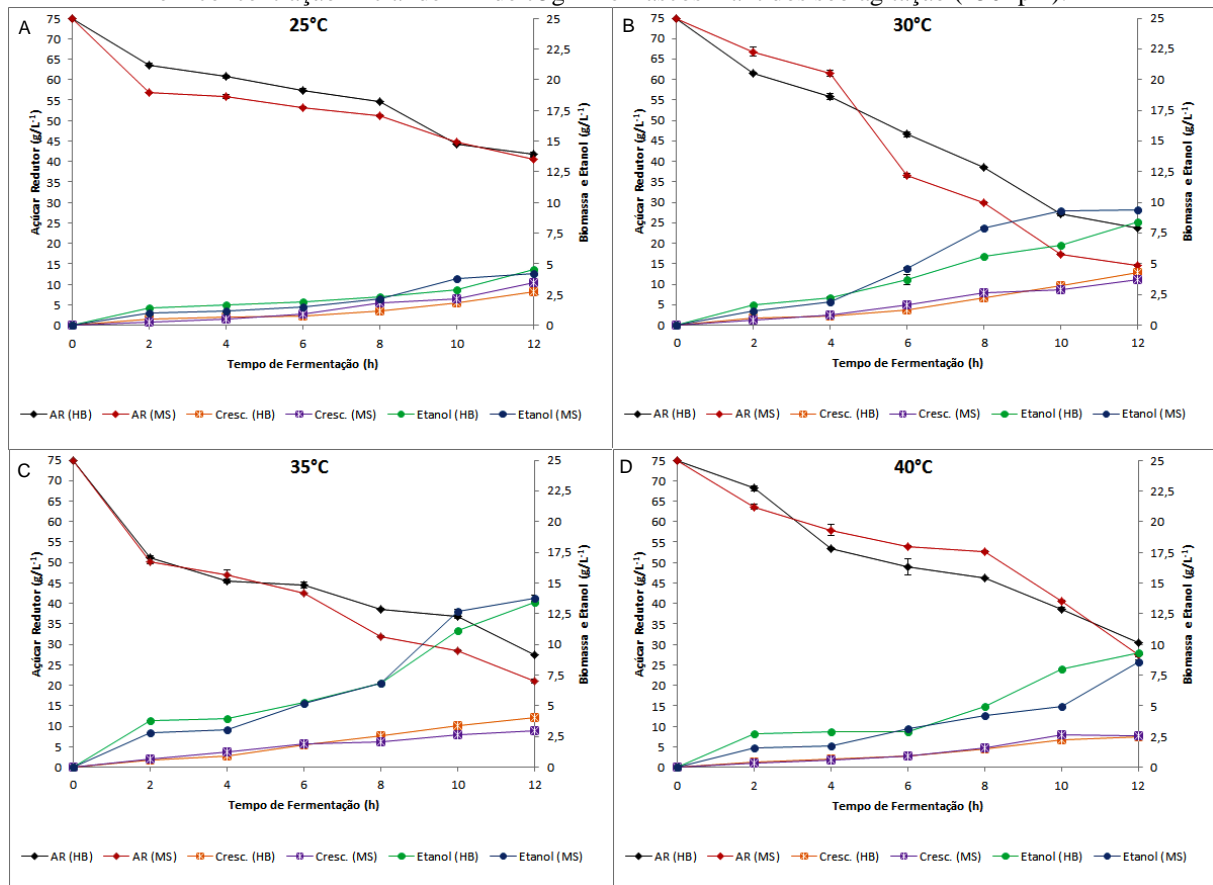
estudo do referido pesquisador, tem-se uma temperatura ótima de atividade da mesma, que nem sempre é compatível com a temperatura ótima para o cultivo da levedura, e quando se utiliza coquetéis enzimáticos com uma única temperatura de incubação, pode-se favorecer ou desfavorecer a atividade enzimática de uma ou outra enzima, comprometendo, conseqüentemente o custo/benefício e desempenho do processo.

A Figura 42 mostra os resultados das fermentações com 12 horas utilizando o meio contendo o Hidrolisado Bruto e Meio Sintético com concentração inicial de AR (açúcares redutores) de  $75 \text{ g L}^{-1}$ , concentração esta três vezes maior do que as utilizadas nos experimentos iniciais, portanto, os meios foram caracterizados como hiper-concentrados. Pode se observar que conforme transcorrido o tempo de incubação da levedura, ocorreu um incremento na biomassa tanto para o Meio Sintético (MS) quanto para o contendo o Hidrolisado Bruto (HB) nos parâmetros testados. O maior e menor crescimento celular no HB ocorreu nas temperaturas de 30 e 40 °C (4,30 g e 2,47 g), respectivamente (Figura 42 B e D), e o mesmo foi válido para o crescimento celular no MS (3,70 g e 2,62 g). Quando aplicada uma agitação mais vigorosa de 150 rpm nos cultivos, observou-se que o crescimento de biomassa foi ligeiramente maior ao fazer um comparativo entre os testes realizados à mesma concentração inicial de açúcares redutores, porém sem incluir agitação nos reatores (Figura 40 B), onde nestes últimos experimentos os maiores crescimentos observados foram 3,23 g para o HB e 2,84 g para o MS. Apesar do maior aumento de biomassa ter ocorrido em temperatura de 30°C, as melhores produções de bioetanol foram de  $13,45 \text{ g L}^{-1}$  para o HB e  $13,76 \text{ g L}^{-1}$  para o MS em 12 horas de fermentação ambos na temperatura de 35°C (Figura 42 C). Em outras palavras, a mais alta produção de etanol pela levedura não ocorreu, necessariamente, na faixa ótima de temperatura observada para o crescimento celular, o que demonstra que tais fatores não estão diretamente relacionados. Já os piores valores de etanol obtidos foram constatados na temperatura de 25°C (Figura 42 A) para o HB e MS, respectivamente ( $4,35 \text{ g L}^{-1}$  e  $4,24 \text{ g L}^{-1}$ ) e também nesta temperatura a cinética de consumo dos açúcares fermentescíveis pela *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 foi muito baixa. Ou seja, no final das 12 horas de fermentação, havia aproximadamente  $40 \text{ g L}^{-1}$  de açúcares residuais nos meios de cultivo, mostrando que mais da metade destes não foi aproveitado no processo fermentativo, se caracterizando como excedente (Figura 42 A).

Na resposta ao estresse causado por meios hiper-osmóticos, um dos eventos mais proeminentes é o acúmulo intracelular de glicerol, que permite à levedura regular sua pressão de turgor e assim adaptar-se às condições osmóticas do meio. A regulação, tanto dos genes

responsáveis pela síntese de glicerol, quanto de outros genes importantes para a sobrevivência sob alta osmolaridade, está sob o controle do fator de transcrição Hog1p. O mesmo é ativado por duas vias de sinalização independentes, deflagradas pelas proteínas de membrana Sho1p ou Sln1p que funcionam como sensores de osmolaridade e ambas são ativadas, por alterações estruturais da membrana plasmática (ABERTYN et al., 1994). Neste trabalho, possivelmente nos experimentos realizados com concentração de açúcares redutores de  $75\text{g L}^{-1}$  houve uma maior produção de glicerol como tentativa da célula de equilibrar o meio hiper-osmótico, portanto, uma baixa produção de etanol também foi observada, já que as fontes de carbono disponíveis possivelmente podem ter sido convertidas majoritariamente em glicerol.

**Figura 42** - Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio contendo Hidrolisado Bruto (HB) e Meio Sintético (MS) em concentração inicial de AR de  $75\text{g L}^{-1}$  e frascos mantidos sob agitação (150 rpm).



A velocidade de agitação foi a única variável que não teve efeito somatório para obtenção das maiores produções de bioetanol nos meios de cultura utilizados para as fermentações, que foram maiores nos experimentos estáticos. Pode-se observar que quando a velocidade de agitação foi de 150 rpm, em todos os meios de cultura esta produção foi menor.

Já para o crescimento celular a agitação foi um fator positivo, uma vez que os maiores aumentos de biomassa foram com velocidade de agitação de 150 rpm. Isto indica que quando se aplica agitação, esta levedura prefere crescer e/ou produzir outros bioprodutos do que etanol.

De forma simplificada, os melhores parâmetros na produção de etanol pela cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a partir do meio contendo o hidrolisado ácido de resíduos de mandioca estão apresentados na Tabela 12, ressaltando que estes resíduos agroindustriais de baixo custo apresentam-se como promissores para a geração de biocombustíveis, visto que no presente trabalho foi possível obter um rendimento de etanol de até 96,5% do máximo teórico descrito na literatura.

Akaracharanya e cols. (2011) encontram que o nível de açúcar redutor obtido a partir de pré-tratamento com 6% (m/v) de fibra lignocelulósica de mandioca suspensos em 2% (v/v) de  $H_2SO_4$  a  $121^\circ C$  atingiu um nível máximo de  $22\text{ g L}^{-1}$  após 30 minutos de tratamento, onde neste momento, os subprodutos inibidores de fermentação como o furfural, hidroximetilfurfural, siringaldeído e vanilina permaneceram abaixo dos limiares de detecção destes ensaios. Foram obtidos rendimentos máximos de etanol após 48 h de incubação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* de  $11,9\text{ g L}^{-1}$ , que correspondeu a um rendimento total de  $0,44\text{ g}$  de etanol/g de glicose. Os resultados encontrados pelo autor foram próximos aos obtidos na presente pesquisa. Em ambos os estudos a hidrólise foi realizada com a mesma concentração de ácido sulfúrico (2%), porém Akaracharanya e cols. (2011) utilizaram tempos maiores de fermentação e obtiveram rendimentos próximos aos descritos aqui, que foram de no máximo  $0,45$ ,  $0,47$  e  $0,49\text{ g}$  etanol/g de glicose.

Em abordagem recente feita por Izmirliloglu e Demirci (2016) foi utilizado hidrolisado de resíduos de batata e avaliou-se parâmetros fermentativos para otimizar o processo (crescimento, pH, temperatura e agitação). As condições ideais para fermentação alcoólica foram o pH de 4,2, temperatura  $34^\circ C$  e 100 rpm, resultando em  $37,05\text{ g L}^{-1}$  de etanol com uma produtividade de  $2,31\text{ g L h}^{-1}$  e rendimento teórico 92,08%. Apesar de tais autores terem escolhido condições diferentes como o pH e agitação, o rendimento foi próximo ao obtido no presente trabalho, entretanto a ausência de agitação nos reatores de fermentação em nosso estudo pode ser benéfica ao se levar em conta o custo benefício do processo industrial.

**Tabela 12.** Resumo da produção de etanol e biomassa por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 utilizando resíduos de mandioca hidrolisados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2% (v/v) em condições favoráveis de fermentação.

| <b>Açúcar Redutor Inicial (g L<sup>-1</sup>)</b> | <b>25g L<sup>-1</sup></b> |       | <b>50g L<sup>-1</sup></b> |  |
|--|---------------------------|-------|---------------------------|--|
| <b>Açúcar Redutor Final (g L<sup>-1</sup>)</b>   | 2,79                      | 6,87  | 8,68                      |  |
| <b>Agitação</b>                                  | Não                       | Não   | Sim (150 RPM)             |  |
| <b>Temperatura</b>                               | 35°C                      | 35°C  | 35°C                      |  |
| <b>Título de etanol (g L<sup>-1</sup>)</b>       | 10,46                     | 21,23 | 18,67                     |  |
| <b>Produtividade (g L/h<sup>-1</sup>)</b>        | 1,04                      | 1,86  | 1,85                      |  |
| <b>Rendimento (g/g glicose)</b>                  | 0,47                      | 0,49  | 0,45                      |  |
| <b>Rendimento Teórico (%)</b>                    | 92,3                      | 96,5  | 88,6                      |  |
| <b>Título de biomassa (g)</b>                    | 3,11                      | 2,90  | 3,80                      |  |

Arapoglou et al. (2010) realizaram hidrólise ácida e enzimática de casca de batata e os hidrolisados foram submetidos à fermentação utilizando *S. cerevisiae* e o pH final da fermentação ficou em torno de 3,89, valores próximos ao pH final das fermentações do presente trabalho. Verificaram que a hidrólise enzimática com uma combinação de três enzimas atingiu a maior liberação de açúcares redutores (18,5 g L<sup>-1</sup>) e foi produzido 7,6 g L<sup>-1</sup> de etanol com rendimento de 0,46 g de etanol/g açúcar consumido, ou seja, 92,6% do rendimento teórico máximo. Já a hidrólise ácida conseguiu a liberação de 18,15 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores fermentescíveis e foram produzidos 6,97 g L<sup>-1</sup> de etanol após 48 horas de fermentação, sendo evidente neste estudo que a hidrólise enzimática de casca de batata liberou quase que a mesma quantidade de AR (açúcares redutores) em comparação com hidrólise ácida com ácido clorídrico, sendo que os rendimentos em etanol obtidos pelos autores foram próximos ao rendimento máximo conseguido no presente estudo (Tabela 12), provavelmente pela similaridade em composição química dos resíduos em questão.

Adicionalmente, foram destacadas também as piores condições para obtenção de etanol celulósico a partir dos resíduos de mandioca provenientes da indústria farinheira, que são mostrados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Resumo da produção de etanol e biomassa por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 utilizando resíduos de mandioca hidrolisados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2% (v/v) em condições desfavoráveis de fermentação.

| <b>Açúcar Redutor Inicial (g L<sup>-1</sup>)</b> | <b>50 g L<sup>-1</sup></b> |              | <b>75g L<sup>-1</sup></b> |  |
|--|----------------------------|--------------|---------------------------|--|
| <b>Açúcar Redutor Final (g L<sup>-1</sup>)</b>   | 15,87                      | 39,92        | 41,79                     |  |
| <b>Agitação</b>                                  | Sim (150 RPM)              | Sim (75 RPM) | Sim (150 RPM)             |  |
| <b>Temperatura</b>                               | 25°C                       | 25°C         | 25°C                      |  |
| <b>Título de etanol (g L<sup>-1</sup>)</b>       | 4,97                       | 4,58         | 4,55                      |  |
| <b>Produtividade (g L/h<sup>-1</sup>)</b>        | 0,61                       | 0,42         | 0,41                      |  |
| <b>Rendimento (g/g glicose)</b>                  | 0,14                       | 0,13         | 0,13                      |  |
| <b>Rendimento Teórico (%)</b>                    | 27,4                       | 25,5         | 25,5                      |  |
| <b>Título de biomassa (g)</b>                    | 3,72                       | 1,43         | 2,69                      |  |

Elemike et al. (2015) realizaram sacarificação de resíduos de mandioca com ácido e amiloglucosidases. Os resultados mostraram que a combinação enzimática e ácida hidrolisou a maior parte do amido e a celulose do que quando foi utilizado um dos métodos separadamente e foi verificado que o HCl diluído foi mais útil em converter os materiais celulósicos a açúcares redutores. Estes achados vão de encontro ao presente trabalho, no qual foi realizada a hidrólise ácida na liberação de açúcares redutores para posterior fermentação. O autor também utilizou uma concentração de inóculo próxima ao nosso estudo (0,2 g de leveduras) e a cinética de fermentação foi estudada em intervalos de 0, 1, 2, 4, 6 e 8 h com uma faixa de pH de 4,6-5,5 e a temperatura de 40-50°C. Com estes parâmetros conseguiu-se um total 2,7 g de etanol/15 g resíduo, ou seja, um rendimento aproximado de 35%. Em resumo, o rendimento de álcool obtido neste estudo foi baixo e pode estar relacionado com a temperatura de incubação da levedura que foi ligeiramente elevada, a qual não compreendeu a faixa ótima de temperatura para a produção de etanol mostrada em nosso trabalho utilizando o mesmo resíduo.

Saravanakumar e Kathiresan (2014) produziram bioetanol com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando serragem de madeira hidrolisada. O rendimento máximo adquirido pela produção de etanol foi de 69,58%. Os parâmetros utilizados foram: temperatura de 30°C, 6,84 g L<sup>-1</sup> de concentração de serragem, agitação de 360 rpm e 89 horas de fermentação. Tais valores foram inferiores aos obtidos no presente trabalho devido à composição química do resíduo ser diferente, e é sabido que hidrolisados lignocelulósicos de madeira contém altas concentrações de compostos inibitórios, principalmente compostos fenólicos que inibem o crescimento de leveduras. Além disso, a temperatura e agitação excessiva também podem ter influenciado negativamente na fermentação, como foi mostrado no presente trabalho.

Moshi et al. (2015 a) realizaram hidrólise alcalina de cascas de mandioca (50 g) suspensas em 200 mL de NaOH (0,5 M) submetidas em autoclave a 121°C durante 15 minutos, e subsequentemente neutralizadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) até pH 5.5. Depois o hidrolisado foi submetido à fermentação a 30±2°C. Neste estudo, o pré-tratamento alcalino combinado com o enzimático antes da SSF levou a um maior rendimento de etanol (95% do rendimento teórico baseado em 0,51 g/g de açúcares fermentescíveis) e o desempenho do processo, tal como indicado pelas elevadas produtividades volumétricas (1,2-1,3 g L h<sup>-1</sup>) em comparação com o que foi conseguido com o substrato tratado apenas com enzimas (0,2-0,5 g L h<sup>-1</sup>). Em relação ao presente trabalho, pode-se observar que o tratamento ácido durante 10

minutos em autoclave à 121°C também obteve sucesso e se mostrou como um processo mais simplificado, e como descrito na literatura, poderia ser mais apropriado, pois não ocasiona degradação extensiva dos carboidratos como ocorre no caso de hidrólise alcalina (Figura 22, p. 78). A subsequente fermentação do hidrolisado de resíduo de mandioca em concentração inicial de açúcares redutores de 50g L<sup>-1</sup> mantido sem agitação à temperatura de 35°C conseguiu uma conversão de 0,49 g/g de açúcar, o que corresponde a um rendimento de 96,5% do valor máximo teórico, e uma produtividade de 1,85 g L h<sup>-1</sup>. A escolha do resíduo, juntamente com o tratamento ácido podem ser vantajosos para a produção de bioetanol, já que, tais resultados se mostram bastante promissores e similares aos relatados por Moshi e colaboradores (2015a).

Sivamani e Baskar (2015) objetivaram a produção de bioetanol a partir da casca de mandioca usando estatística de design experimental no qual se escolheram três fatores (concentração do substrato de 10-70 g L<sup>-1</sup>, concentração de  $\alpha$ -amilase de 5-25% v/v e sacarificação e fermentação simultânea (SSF) contendo uma mistura de glucoamilase e *Zymomonas mobilis* (5,15%; 25,75% v/v respectivamente). A concentração máxima de etanol obtida em condições ótimas foram concentração de 69,82 g L<sup>-1</sup> de substrato, concentração de  $\alpha$ -amilase de 24,74% (v/v) e 5,22% (v/v) da mistura SSF, rendeu 35,018 g L<sup>-1</sup> de etanol, 83% de rendimento máximo teórico. Tais valores se mostraram inferiores aos obtidos no presente estudo, e mesmo que o resíduo utilizado tenha sido semelhante, os autores utilizaram uma espécie de microrganismo diferente e mais sensível à presença de compostos tóxicos inibitórios, e por isso provavelmente não se mostrou tão eficiente quando se utiliza leveduras como a *Saccharomyces* em processos fermentativos.

Choonut et al. (2014) avaliaram a produção de etanol a partir de casca de abacaxi, na qual 36,25±2,87% de celulose foi obtida após pré-tratamento com água e calor à 100°C durante 4 h. A produção de açúcar máximo (34,03±1,30 g L<sup>-1</sup>) foi obtida após 24 h de hidrólise enzimática com celulases. O rendimento máximo de etanol (9,69 g L<sup>-1</sup>) a partir *S. cerevisiae* foi obtido após 72 h de fermentação, 56% do rendimento máximo teórico a partir da referida concentração de açúcar. Este valor foi menor do que os obtidos por nosso estudo, provavelmente por conta da matéria-prima utilizada ter sido diferente, bem como as condições das fermentações que foram conduzidas a um pH 5,0, temperatura de 30°C, e visto que a fermentação foi realizada por tempo prolongado ainda sim se obteve baixas concentrações de etanol.

Silva (2007) desenvolveu um estudo com a utilização de *Pichia stipitis* para realizar fermentação do hidrolisado da palha de arroz para produção de etanol. O autor neste trabalho alterou o meio de fermentação e sua produção aumentou 14%. Ele inseriu agitação/aeração nos frascos de fermentação e obteve um aumento de 63% na produtividade e 24% na conversão em etanol. O mesmo não ocorreu com os experimentos realizados no presente trabalho, visto que a agitação dos reatores não favoreceu a produção de etanol, provavelmente porque em meios aerados *Saccharomyces cerevisiae* altera sua rota metabólica para realizar respiração aeróbia e crescimento celular, o que de fato pode ser percebido pelo maior aumento de biomassa nos experimentos, realizados neste estudo, onde se submeteu os cultivos em agitação, conseqüentemente, houve o comprometimento da produção de etanol.

Hidrolisado de casca de batata foi utilizado por Hashem e Darwish (2010) como meio de cultivo para fermentações com *S. cerevisiae* e foram testadas diferentes temperaturas de incubação (30, 35, 37 e 40°C). O rendimento máximo de etanol (5,52 g L<sup>-1</sup>) foi obtido a 35°C, temperatura que vai de encontro à temperatura na qual foram conseguidos os melhores resultados do presente trabalho, porém eles obtiveram menor quantidade de etanol porque utilizaram concentração de AR mais baixa para o resíduo de batata.

Ren et al. (2016) avaliaram a produção de etanol a partir da palha de milho pré-tratada com 4% NaOH a 75°C durante 3 horas. Foram realizados testes de cultivo com meio contendo 84 g L<sup>-1</sup> de açúcares a 28°C, 30°C, 35°C e 37°C e agitação de 180 rpm, e foi verificado que a cepa *S. cerevisiae* produziu 39,15 g L<sup>-1</sup> de etanol, 4,38 g de massa de célula seca em 35°C com um rendimento em etanol de 0,46 g/g de glicose, ou seja, aproximadamente 91% de conversão. Foi verificado que a glicose foi completamente consumida em 48 h, e a produtividade de etanol atingiu 0,82 g L h<sup>-1</sup>. Este resultado indicou que a estirpe teve forte capacidade para produzir etanol a partir de glicose a 35°C, e as maiores produções de etanol de nosso presente trabalho se aproximam dos dados fornecidos na literatura, assim como a formação de biomassa que foi próxima ao descrito pelos autores. Em nossa pesquisa foi verificado também que a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 teve suas melhores produções de etanol e produtividade elevada em temperatura de 35°C (Tabela 12), assim como relatado por Ren e colaboradores (2016), mesmo na ausência de agitação. Estes autores utilizaram pré-tratamento alcalino durante 3 horas de processamento, e a menor produção de etanol relatada por eles pode estar relacionada com o tipo de resíduo e o tratamento químico utilizado que foi diferente.



Em um trabalho recente elaborado por Mendes e cols. (2016), avaliou-se a produção de etanol a partir de lamas primárias da indústria de papel e celulose sem tratamento prévio, a partir de um processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) precedida com celulasas à temperatura de 38°C, próxima à temperatura selecionada no presente trabalho (35°C) na qual obtivemos as melhores produções globais de etanol. No referido estudo os autores optaram pela mesma cepa que utilizamos em nossos experimentos (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602) e partiram de uma concentração de 150 g L<sup>-1</sup> de carboidratos e a fermentação alcançou 41,7 g L<sup>-1</sup> de etanol, rendimento de 48,9% e produtividade de 0,78 g L h<sup>-1</sup>. Verificaram ainda que a remoção de esterilização pode ser considerada, diminuindo custos e tempo de processo. O rendimento em etanol alcançado pelo estudo citado foi a metade do rendimento máximo obtido em nossa pesquisa (96,5%), possivelmente devido ao tipo de fermentação realizada (SSF) que conteve elevado conteúdo de sólidos (21,7%) sem tratamento prévio da matéria-prima, conseqüentemente, a liquefação da mistura inicial foi dificultada e a produção de etanol pode ter sido limitada.

Em outra pesquisa feita com hidrolisado de resíduos de mandioca por Teerapatr et al. (2004) tais autores observaram que a concentração máxima foi de 3,62% (m/v), ou seja, 28,56 g L<sup>-1</sup> de etanol, o que correspondeu a 62,8% do rendimento teórico após 24 horas de fermentação dos açúcares redutores iniciais na concentração de 89,2 g L<sup>-1</sup>. Foi verificado ainda que o custo de produção de um litro de etanol a partir deste hidrolisado pré-tratado enzimaticamente foi 1,5 vezes mais elevado do que a partir de uma raiz de mandioca. Contudo, considerando o impacto negativo dos resíduos da mandioca despejados no meio ambiente e o fato de que a operação de aterramento poderia ser diminuída até 81%, o processo pode ser ambientalmente saudável e de enorme benefício econômico, pois não compete com a cultura de mandioca destinada à alimentação. Assim, a utilização dos resíduos de mandioca para a produção de etanol pode fornecer uma utilização eficaz dos recursos naturais e levar ao desenvolvimento e aprimoramento das tecnologias buscando redução de custos, de tal modo como foi realizado no presente estudo.

## 6. CONCLUSÕES

A hidrólise dos resíduos de mandioca com 2% (v/v) de ácido sulfúrico durante 10 minutos de aquecimento (121°C) foi eficaz na liberação dos açúcares fermentescíveis a serem utilizados como substrato fermentativo (134,84g L<sup>-1</sup>). No entanto, hidrólise ácida promovida na ausência de temperatura e pressão elevada se mostrou aquém dos resultados obtidos acima, visto que os melhores índices para esta série de experimentos foram de 5,20 g L<sup>-1</sup> e 4,34 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores e glicose, respectivamente, em concentração de 2,5% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 96 horas de tratamento. Tais valores foram muito baixos, tornando esta metodologia inviável a nível industrial por conta da baixa liberação de açúcares fermentescíveis, bem como o longo prazo de reação, o que acabou justificando a aplicação de calor na reação de hidrólise ácida da biomassa.

O resíduo hidrolisado mostrou baixas concentrações de compostos fenólicos (0,27-0,58mg/g resíduo de mandioca) devido sua composição química conter pouca lignina. Portanto, a detoxificação não se mostrou necessária para a produção de bioetanol com a *S. cerevisiae* ATCC 26602, e foi observado que a presença de compostos fenólicos não exerceu inibição microbiana.

Na fermentação alcoólica, as melhores condições para produção de bioetanol do presente estudo foram: meio contendo o hidrolisado bruto (sem detoxificação prévia), concentração inicial de açúcar redutor 50g L<sup>-1</sup>, 10 horas de fermentação à 35°C, frascos mantidos sem agitação, pH inicial de 6,5. Tais parâmetros resultaram em 21,23 g L<sup>-1</sup> de etanol com uma produtividade de 1,86 g L h<sup>-1</sup> e rendimento teórico de 96.5% (0.49 g/g açúcar fermentescível). Adicionalmente, a concentração inicial de AR teve influência significativa nos experimentos realizados, visto que nos hidrolisados hiperconcentrados (75g L<sup>-1</sup> de AR inicial) ocorreu inibição microbiana por estresse osmótico e se observaram baixas produções de etanol, produtividade e consumo de açúcares pela levedura. Por último, o incremento de agitação nos reatores de fermentação favoreceu o crescimento celular, porém não foi um parâmetro favorável na produção de etanol.

Em vista do exposto, o desenvolvimento de tecnologias adequadas para o uso de matérias-primas baratas (lignocelulósicas) perfaz uma contribuição significativa na redução dos custos de produção e maior universalização do uso de etanol combustível. Em termos gerais, portanto, o álcool gera uma energia cada vez mais “limpa”, característica invejável e cada vez mais atrativa num mundo onde cresce a preocupação econômica e ambiental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-CAVALHEIRO, A.; MONTEIRO, G. Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. **Braz. J. Microbiol.**, v. 44, n. 3, p. 665-671, 2013.

ADEBOYE, P. et al. Catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid by *Saccharomyces cerevisiae* yields less toxic products. **Microbial Cell Factories.**, v. 14, n. 1, p.1-14, 2015.

ADEBOYE, P.; OLSSON, L.; BETTIGA, M. A coniferyl aldehyde dehydrogenase gene from *Pseudomonas* sp. strain HR199 enhances the conversion of coniferyl aldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 212, n. 1, p. 11-19, 2016.

ADEKUNLE, A.; ORSAT, V.; RAGHAVAN, V. Lignocellulosic bioethanol: A review and design conceptualization study of production from cassava peels. **Ren. Sust. En. Rev.**, v. 64, n. 1, p. 518-530, 2016.

ADEREMI, F.; NWORGU, F. Nutritional status of cassava peels and root sieviate biodegraded with *Aspergillus niger*. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, v. 2, n. 3, p. 308-311, 2007.

ADETUNJI, A. et al. Complementary effects of cell wall degrading enzymes together with lactic acid fermentation on cassava tuber cell wall breakdown. **Industrial Crops and Products**, v. 90, n. 1, p.110-117, 2016.

AGU, R. et al. Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (CGW) biomass for ethanol production. **J. Sci. Res. Chula. Univ.**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2006.

AKARACHARANYA, A. et al. Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**, vol. 61, no. 3, pp. 431-436, 2011.

ALBERTYN, J.; HOHMANN, S.; PRIOR, B. Characterization of the osmotic-stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. **Curr. Genet.**, v. 25, n. 1, p. 12-18, 1994.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

AMORIM, S.; MEDEIROS, R.; RIET-CORREA, F. Intoxicações por plantas cianogênicas no Brasil. **Ciência Animal**, v. 16, n. 1, p. 17-26, 2006.

ANDO, S. et al. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influence on ethanol fermentation. **J. Ferment. Technol.**, v. 64, n. 6, p. 567-570, 1986.

ANDRIETTA, M. et al. Bioethanol: Brazil, 30 years of Proalcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.

ANDRIETTA, S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. Study of flocculent yeast performance in tower reactors for bioethanol production in a continuous fermentation process with no cell recycling. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3002-3008, 2008.

ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS. **Boletim do Etanol**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?id=474>>. Acesso em: 03 abr. 2016.

ARAPOGLOU, D. et al. Ethanol production from potato peel waste (PPW). **Waste Management**, v. 30, n. 1, 2010.

BAI, F.; ANDERSON, W.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.

BAILEY, J. Toward a science of metabolic engineering. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1668-1675, 1991.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 155-162, 2011.

BALLESTEROS, I. et al. Optimization of the simultaneous saccharification and fermentation process using thermotolerant yeasts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 201-211, 1993.

BANERJEE, S. et al. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, n. 1, p. 77-93, 2010.

BASSO, L. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **Fems. Yeast Res.**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BAYITSE, R. et al. Optimisation of enzymatic hydrolysis of cassava peel to produce fermentable sugars. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2015.

BEALL, D.; OHTA, K.; INGRAM, L. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 38, n. 3, p. 296-303, 1991.

BECKER, J.; CRAIG, E. Heat-shock proteins as molecular chaperones. **Eur. J. Biochem.**, v. 219, n. 1-2, p. 11-23, 1994.

BEHERA, S.; MOHANTY, R. C.; RAY, R. C. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 2352-2355, 2010.

BINOD, P. et al. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, 2010.

BNDES – BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO. **Plano Conjunto BNDES-FINEP de Apoio à Inovação Tecnológica Industrial dos Setores Sucroenergético e Sucroquímico (PAISS)**. Disponível em: <[http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes\\_pt/Areas\\_de\\_Atuação/Inovacao/paiss/](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_pt/Areas_de_Atuação/Inovacao/paiss/)>. Acesso em: 12 mar. 2016.

BOKANGA, M. Distribution of cyanogenic potential in the cassava germplasm. **ISHS Acta Hortic.**, v. 375, n. 1, p. 117-123, 1994.

BOONNOP, K. et al. Enriching nutritive value of cassava root by yeast fermentation. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 5, p. 629-633, 2009.

BORODINA, I.; NIELSEN, J. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. **Biotechnol. J.**, v. 9, n. 5, p. 609-620, 2014.

BOULTON, R. et al. **Principles and practices of winemaking**. 1<sup>a</sup>. ed. New York: Spring, 1996, 547p.

BOYER, L. et al. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n. 1, p. 41-48, 1992.

BRACELPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. **Resultados do Setor de Celulose e Papel**. Disponível em: <<http://tissueonline.com.br/conjuntura-bracelpa-resultados-setor-de-celulose-e-papel/>>. Acesso em: 15 mai. 2016.

BUCKERIDGE, M.; SANTOS, W.; SOUZA, A. As Rotas para o Etanol Celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. **Bioetanol para Cana de Açúcar, P&D para Produtividade e Sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010, p. 365-380.

BURNS, A. et al. Variations in the chemical composition of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves and roots as affected by genotypic and environmental variation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, n. 19, p. 4946-4956, 2012.

CADETE, R. et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Res.**, v. 9, n. 8, p. 1338-1342, 2009.

CAI, Z. et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: reflections and perspectives. **J. Biotechnol.**, v. 7, n. 1, p. 34–46, 2012.

CALDAS NETO, S. et al. Mandioca e resíduos das farinhas na alimentação de ruminantes: digestibilidade total e parcial. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 29, n. 6, p. 2099-2108, 2000.

CAMERON, D.; TONG, I. Cellular and metabolic engineering: an overview. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 38, n. 1-2, p. 105-140, 1993.

CARDONA, C.; SÁNCHEZ, Ó. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

CEREDA, M.; MATTOS, M. Linamarin: the toxic compound of cassava. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 2, n. 1, p. 6-12, 1996.

CEREDA, M.; VILPOUX, O. Tecnologia, uso e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas, In: \_\_\_\_\_ **Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas**, v.3, São Paulo: Fundação Cargill, 2003, 771p.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 1, p. FCT67-FCT72, 2004.

CHENG, KE-KE. et al. Sugarcane bagasse hemicelluloses hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochem. Eng. J.**, v. 38, n. 1, p. 105-109, 2008.

CHISTI, Y. Fermentation (Industrial): Basic considerations. **Encyclopedia of Food Microbiology**, p. 663-674, 1999.

CHOI, G.; KANG, H.; MOON, S. Repeated-batch fermentation using flocculent hybrid, *Saccharomyces cerevisiae* CHFY0321 for efficient production of bioethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 84, n. 2, p. 261-269, 2009.

CHOONUT, A. et al. The production of ethanol and hydrogen from pineapple peel by *Saccharomyces cerevisiae* and *Enterobacter aerogenes*. **Energy Procedia**, v. 52, n. 1, p. 242-249, 2014.

CLARO, F.; RIJSBRACK, K.; SOARES, E. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, n. 3, p. 693-700, 2007.

COGEN – ASSOCIAÇÃO DA INDÚSTRIA DE COGERAÇÃO DE ENERGIA. **Biomassa e Bioeletricidade**. Disponível em: <<http://www.cogen.com.br/cogeracao/cogeracao-no-brasil/bioeletricity>>. Acesso em: 27 mar. 2016.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perfil do Setor Sucroalcooleiro e Levantamento de Safras**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acesso em: 05 jun. 2016.

DAVIES, S.; BRINDLE, K. Effects of overexpression of phosphofructokinase on glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v. 31, n. 19, p. 4729-4735, 1992.

DE BARI, I. et al. Bioethanol production from steam-pretreated corn stover through an isomerase mediated process. **New Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 185-195, 2014.

DEMEKE, M. et al. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 26, n. 89, p. 1-24, 2013.

DEMIRBAS, A. Energy and environmental issues relating to greenhouse gas emissions in Turkey. **Energy Convers. Manage.**, v. 44, n. 1, p. 201-213, 2003.

DING, J. et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 85, n. 2, p. 253-263, 2009.

DING, S.; HIMMEL, M. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 3, p. 597-606, 2006.

DOLES<sup>TM</sup> REAGENTES – **Instruções de Produtos: Glicose Enzimática Líquida**. Disponível em: <<http://www.doles.com.br/produtos/instrucoes/0fe92b177750ab1a4d4078d1eec60b65.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

DONG, SHI-JUN.; YI, CHEN-FENG.; LI, H. Changes of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane components and promotion to ethanol tolerance during the bioethanol fermentation. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 69, n. 1, p. 196-203, 2015.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, n. 1, p. 350-356, 1956.

DUSSÁN, K. et al. Dilute-acid hydrolysis of cellulose to glucose from sugarcane bagasse. **Chem. Eng. Trans.**, v. 38, n. 1, p. 433-438, 2014.

DYK, J.; PLETSCHE, B. A review of lignocelluloses bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

ELEMIKE, E.; OSEGHLE, O.; OKOYE, A. Utilization of cellulosic cassava waste for bio-ethanol production. **J. Env. Chem. Eng.**, v. 3, n. 4, p. 2797-2800, 2015.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cultivo, produção nacional e internacional de mandioca**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mandioca>>. Acesso em: 19 jul. 2016.

EPE – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis: Boletins Periódicos**. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/Petroleo/Paginas/PaineldeBiocombust%C3%ADveis%E2%80%93Boletinsdean%C3%A1liseconjuntura.aspx>>. Acesso em: 15 abr. 2016.

ERIKSSON, P. et al. Cloning and characterisation of GPD2, a second gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD1) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with GPD1. **Mol. Microbiol.**, v. 17, n. 1, p. 95-107, 1995.

ERNANDES, F.; GARCIA-CRUZ, C. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 361-380, 2009.

EZEJIOFOR, N.; ENEBAKU, E.; OGUEKE, C. Waste to wealth value recovery from agro-food processing wastes using biotechnology: a review. **J. Br. Biotechnol.**, v. 4, n. 4, p. 418-481, 2014.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Cassava Agriculture**. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/en/1/>>. Acesso em: 04 jul. 2016.

FAO/WHO. Codex standard for sweet cassava. In: **Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Alimentarius Commission; Food and Agriculture Organisation and World Health Organisation of the United Nations**. Rome/Italy, vol. 238, Codex Standard, 2003.

FERNANDES, P. *Saccharomyces cerevisiae* response to high hydrostatic pressure. **Journal ASM Science**, v. 1, n. 1, p. 145-166, 2008.

FERREIRA, G. et al. Valor Nutritivo de co-produtos da Mandioca. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 8, n. 4, p. 364-374, 2007.

FERREIRA, M.; SILVA, J. Utilização da casca, entrecasca e raspa da mandioca na alimentação de ruminantes. **Rev. Bras. Agropec. Sust.**, v. 1, n. 2, p. 64-66, 2011.

FERREIRA, V.; ROCHA, D.; SILVA, F. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Quím. Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.



FESTUCCI-BUSELLI, R.; OTONI, W.; JOSHI, C. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2007.

FRANCO, C. et al. Propriedades gerais do amido. v. 1. **Série cultura de tuberosas amiláceas latino americanas**. CEREDA, M. (coord.). São Paulo: Fundação Cargill, 2001, 224p.

FU, N. et al. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 3, p. 210-217, 2009.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochem. Eng. J.**, v. 44, n. 1, p. 2-12, 2009.

FURLAN, A. D. F. **Produção de bioetanol de segunda geração pelo consórcio *Zymomonas mobilis* CCT4494 e *Candida tropicalis* em resíduos de uvas Isabel e Bordô**. 2015. 92 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

GIBSON, B. et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 31, n. 5, p.535-569, 2007.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546–567, 1996.

GORSICH, S. et al. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 71, n. 3, p. 339-349, 2006.

GOVENDER, P.; BESTER, M.; BAUER, F. FLO gene-dependent phenotypes in industrial wine yeast strains. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 86, n. 3, p. 931–945, 2010.

GUIMARÃES, P. et al. Adaptive Evolution of a Lactose-Consuming *Saccharomyces cerevisiae* Recombinant. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 6, p. 1748-1756, 2008.

GUPTA, A.; VERMA, J. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Ren. Sust. En. Rev.**, v. 41, n. 1, p. 550-567, 2015.

GUSTAVSSON, J.; STAGE, J. Retail waste of horticultural products in Sweden. **Resour. Conserv. Recycl.**, v. 55, n. 1, p.554–556, 2011.

GUTIÉRREZ-RIVERA, B. et al. Conversion efficiency of glucose/xylose mixtures for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV01 and *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 87, n. 2, p. 263-270, 2012.

HA, SUK-JIN. et al. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 108, n. 2, p. 504-509, 2011.

HAHN-HÄGERDAHL, B. et al. Pentose fermentation to alcohol. **Biotechnol. Agric.**, v. 9, n. 1, p. 231-290, 1993.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. An interlaboratory comparison of the performance of ethanol-producing microorganisms in a xylose-rich acid hydrolysate. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 41, n. 1, p. 62-72, 1994.

HASHEM, M.; DARWISH, S. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 1, p. 953-959, 2010.

HASUNUMA, T. et al. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2011.

HASUNUMA, T.; ISHI, J.; KONDO, A. Rational design and evolutionary fine tuning of *Saccharomyces cerevisiae* for biomass breakdown. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 29, n. 1, p. 1-9, 2015.

HE, M. et al. *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. **Biotechnol. Biofuels**, v. 7, n. 101, p. 1-15, 2014.

HEIPIEPER, H. et al. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, v. 12, n. 10, p. 409-415, 1994.

HIRASAWA, T.; FURUSAWA, C.; SHIMIZU, H. *Saccharomyces cerevisiae* and DNA microarray analyses: what did we learn from it for a better understanding and exploitation of yeast biotechnology? **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, n. 2, p. 391-400, 2010.

HO, N.; CHEN, Z.; BRAINARD, A. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 5, p. 1852-1859, 1998.

HOPPE, S.; SHIKIDA, P.; SILVA, J. Economic and financial analysis of distillery for alcohol from cassava establishing. **Rev. Bras. Gestão Urbana**, v. 1, n. 2, p. 245-257, 2009.

IEA – INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Renewable Bioenergy: Energy Technology Perspectives**. Disponível em: <<https://www.iea.org/topics/renewables/subtopics/bioenergy/>>. Acesso em: 07 abr. 2016.

INNIS, M. et al. Expression, glycosylation, and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Science**, v. 228, n. 4625, p. 21-26, 1985.

ISHOLA, M.; ISROI; TAHERZADEH, M. Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from oil palm empty fruit bunches. **Bioresource Technology**, v. 165, n. 1, p. 9-12, 2014.

IWUOHA, G.; UBENG, G.; ONWUACHU, U. Detoxification Effect of Fermentation on Cyanide Content of Cassava Tuber. **J. Appl. Sci. Environ. Manage.**, v. 17, n. 4, p. 567-570, 2013.

IZMIRLIOGLU, G.; DEMIRCI, A. Ethanol production in biofilm reactors from potato waste hydrolysate and optimization of growth parameters for *Saccharomyces cerevisiae*. **Fuel**, v. 181, n. 1, p. 643-651, 2016.

JANSE, B.; PRETORIUS, I. One-step enzymatic hydrolysis of starch using a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing alpha-amylase, glucoamylase, and pullulanase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 42, n. 6, p. 878-883, 1995.

JAYAKODY, L.; HAYASHI, N.; KITAGAKI, H. Identification of glycolaldehyde as the key inhibitor of bioethanol fermentation by yeast and genome-wide analysis of its toxicity. **Biotechnol. Lett.**, v. 33, n. 2, p. 285-292, 2011.

JIN, Y.; RITCEY, L.; SPEERS, R. Effect of cell surface hydrophobicity, charge, and zymolectin density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 59, n. 1, p. 1-9, 2001.

JIN, Y.; SPEERS, R. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v. 31, n. 6-7, p. 421-440, 1998.

JÖNSSON, L. et al. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 49, n. 6, p. 691-697, 1998.

JÖNSSON, L.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, NILS-OLOF. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, n.1, p.1-16, 2013.

JULES, M. et al. New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: *NTH2* encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of *TPS1* reveals Ath1p-dependent trehalose mobilization. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 3, p. 605-614, 2008.

KADAM, K.; MCMILLAN, J. Availability of corn stover as a sustainable feedstock for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 1, p. 17-25, 2003.

KANG, L.; WANG, W.; LEE, Y. Bioconversion of kraft paper mill sludges to ethanol by SSF and SSCF. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 16, n. 1-8, p.53-66, 2010.

KARAPATSIA, A. et al. Fed-batch *Saccharomyces cerevisiae* fermentation of hydrolysate sugars: A dynamic model-based approach for high yield ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 90, n. 1, p. 32-41, 2016.

KHAWLA, B. et al. Potato peel as feedstock for bioethanol production: A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 52, n. 1, p. 144-149, 2014.

KIM, S. et al. Effect of fermentation inhibitors in the presence and absence of activated charcoal on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 36, n. 6, p. 659-666, 2013.

KIM, S. et al. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. **Trends Biotechnol.**, v. 30, n. 5, p. 274-282, 2012.

KLIS, F.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185-202, 2006.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 223-253, 2010.

KONGKIATTIKAJORN, J.; SORNVORAWEAT, B. Comparative study of bioethanol production from cassava peels by monoculture and co-culture of yeast jirasak. **Kasetsart J.**, v. 45, n. 1, p.268-274, 2011.

KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, n. 6, p. 776-783, 1993.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

LACERDA, L. et al. Thermoanalytical and starch content evaluation of cassava bagasse as agro-industrial residue. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. 1, p. 143-150, 2009.

LARSSON, S. et al. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulosic hydrolysates of spruce. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 77, n. 1, p. 91-103, 1999(a).

LARSSON, S. et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enz. Microb. Technol.**, v. 24, n. 3-4, p. 151-159, 1999(b).

LARSSON, S.; CASSLAND, P.; JÖNSSON, L. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 3, p. 1163-1170, 2001.

LATIF, F.; RAJOKA, M. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 57-63, 2001.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LAVOVÁ, B. et al. Diauxic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Microbiol. Biotech. Food Sci.**, v. 3, n. 1, p. 122-123, 2014.

LAWFORD, H.; ROUSSEAU, J. Production of ethanol from pulp mill hardwood and softwood spent sulfite liquors by genetically engineered *E. coli*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 39, n. 40, p. 667-685, 1993.

LI, F. et al. An innovative consecutive batch fermentation process for very high gravity ethanol fermentation with self-flocculating yeast. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 84, n. 6, p. 1079-1086, 2009.

LI, YUN-CHENG et al. Functional expression of xylose isomerase in flocculating industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain for bioethanol production. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 121, n. 6, p. 685-691, 2016.

LIMA, A.; RODRIGUES, A. Sacarificação de Resíduos Celulósicos com Bactérias Recombinantes como Estratégia para Redução do Efeito Estufa. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 1, n. 2, p. 5-18, 2007.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Prog. En. Comb. Sci.**, v. 38, n. 4, p. 449-476, 2012.

LIN, H. et al. Production of raw cassava starch-degrading enzyme by *Penicillium* and its use in conversion of raw cassava flour to ethanol. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, n. 1, p. 733-742, 2011.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 69, n. 6, p. 627-642, 2006.

LIN, Y. et al. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, n. 1, p. 395-401, 2012.

LIU, JING-JING. et al. Lactose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of fermenting cellobiose. **Journal of Biotechnology**, In Press Accepted Manuscript, p. 31, available online 25 jul., 2016.

LORENZETTI, M.; MORO, M.; GARCÍA-CRUZ, C. Alginate/PVA beads for levan production by *Zymomonas mobilis*. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, n. 1, p. 31-36, 2014.

LU, X. et al. Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. **Chem. Eng. Technol.**, v. 30, n. 7, p. 938-944, 2007.

LUDWIG, D. et al. Development and optimization of single and combined detoxification processes to improve the fermentability of lignocellulose hydrolyzates. **Bioresource Technology**, v. 133, n. 1, p. 455-461, 2013.

LUTTIK, M. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 38, p. 24529–24534, 1998.

MA, M. et al. Ultrastructural changes of *Saccharomyces cerevisiae* in response to ethanol stress. **Can. J. Microbiol.**, v. 59, n. 9, p. 589-597, 2013.

MA, Y. et al. Efficient utilization of starch by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase and isoamylase. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 31, n. 1, p. 55-59, 2000.

MACEDO, I. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos avançados**, v. 21, n. 59, p. 157-165, 2007.

MACHADO, C. ABREU, F. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. **Revista de Política Agrícola**, v. 15, n. 3, p. 64-78, 2006.

MADIGAN, M. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 12<sup>a</sup>. ed., California: Pearson Education, 2009, 1061p.

MAHMUD, S.; HIRASAWA, T.; SHIMIZU, H. Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 103, n. 3, p. 262-266, 2010.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agroenergia, Estatísticas e Acompanhamento da Produção sucroalcooleira**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/agroenergia>>. Acesso em: 24 mar. 2016.

MASIERO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Rev. Bras. Pol. Int.**, v. 51, n. 2, p. 60-79, 2008.

MEINANDER, N.; ZACCHI, G.; HAHN-HÄGERDAL, B. A heterologous reductase affects the redox balance of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 142, n. 1, p. 165-172, 1996.

MENDES, C. V. et al. Integrated bioconversion of pulp and paper primary sludge to second generation bioethanol using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602. **Bioresource Technology**, v. 220, n. 1, p. 161-167, 2016.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocelluloses: Biofuels, platform chemical e biorefinary concept. **Prog. En. Comb. Sci.**, v. 38, n. 4, p. 522-550, 2012.

MICHELAN, A. et al. Utilização da casca de mandioca desidratada na alimentação de coelhos. **Acta Sci. Anim. Sci.**, v. 28, n. 1, p. 31-37, 2006.

MIKI, B. et al. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 150, n. 2, p. 878-889, 1982.

MME – MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Boletim Mensal de Combustíveis Renováveis**. Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/web/guest/secretarias/petroleo-gas-natural-e-combustiveis-renovaveis/publicacoes/boletim-mensal-de-combustiveis-renovaveis?\\_20\\_displayStyle=descriptive&p\\_p\\_id=20](http://www.mme.gov.br/web/guest/secretarias/petroleo-gas-natural-e-combustiveis-renovaveis/publicacoes/boletim-mensal-de-combustiveis-renovaveis?_20_displayStyle=descriptive&p_p_id=20)>. Acesso em: 15 abr. 2016.

MOJOVIC, L. et al. Production of bioethanol from corn meal hydrolysates. **Fuel**, v. 85, n. 12, p. 1750-1755, 2006.

MORAES-DALLAQUA, M.; CORAL, D. Morfoanatomia. In: CEREDA, M. **Agricultura: tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002, p.48-65.

MOSHI, A. et al. Characterisation and evaluation of a novel feedstock, *Manihot glaziovii*, Muell. Arg, for production of bioenergy carriers: Bioethanol and biogas. **Bioresource Technology**, v. 172, n. 1, p. 58-67, 2014.

MOSHI, A. et al. Combined production of bioethanol and biogas from peels of wild cassava *Manihot glaziovii*. **Chem. Eng. J.**, v. 279, n. 1, p. 297-306, 2015 (a).

MOSHI, A. et al. Production of bioethanol from wild cassava *Manihot glaziovii* through various combinations of hydrolysis and fermentation in stirred tank bioreactors. **British Biotechnology Journal**, v. 5, n. 3, p. 123-139, 2015 (b).

MULKO, L. et al. Bioethanol production by reusable *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in a macroporous monolithic hydrogel matrices. **Journal of Biotechnology**. v. 233, n. 1, p. 56-65, 2016.

NANSSOU, P.; NONO, Y.; KAPSEU, C. Pretreatment of cassava stems and peelings by thermohydrolysis to enhance hydrolysis yield of cellulose in bioethanol production process. **Renewable Energy**, v. 97, n. 1, p. 252-265, 2016.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, v. 153, n. 1, p. 375-380, 1944.

NEVOIGT, E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 72, n. 3, p. 379-412, 2008.

NILVEBRANT, N. et al. Limits for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 105-108, n. 1, p. 615-628, 2003.

NISSEN, T. et al. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metab. Eng.**, v. 2, n. 1, p. 69-77, 2000.

NORONHA, L. et al. Utilização de diferentes tipos de policloreto de alumínio para purificação de hidrolisado de bagaço de cana através da técnica de coagulação e floculação. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 1698-1702, 2010.

NUGROHO, R.; YOSHIKAWA, K.; SHIMIZU, H. Metabolomic analysis of acid stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 120, n. 4, p. 396-404, 2015.

NURHAYATI et al. Immobilization of *Zymomonas mobilis* with Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-modified polyvinyl alcohol for continuous ethanol fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v. 114, n. 1, 2016.

OBOH, G. Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus spp* solid media fermentation techniques. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 46-49, 2006.

OBOH, G.; AKINDAHUNSI, A. Biochemical changes in cassava products (flour & gari) subjected to *Saccharomyces cerevisiae* solid media fermentation. **Food Chemistry**, v. 82, n. 4, p. 599-602, 2003.

OGEDA, T.; PETRI, D. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OHTA, E. et al. Metabolomic approach for improving ethanol stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 121, n. 4, p. 399-405, 2016.

OLANBIWONINU, A.; ODUNFA, S. Production of fermentable sugars from organosolv pretreated cassava peels. **Adv Microbiol.**, v. 5, n. 1, p. 117-122, 2015.

OLIVEIRA, M.; VAUGHAN, B.; RYKIEL JR., E. Ethanol as Fuel: Energy, Carbon dioxide Balances, and Ecological Footprint. **BioScience**, v. 55, n. 7, p. 593-602, 2005.



OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol.Mol. Biol.**, v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.

PALMQVIST, E. et al. Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce with *Saccharomyces cerevisiae* and on-line monitoring of glucose and ethanol. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 50, n. 1, p. 545-551, 1998.

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

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PAMPULHA, M.; LOUREIRO-DIAS, M. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, n. 5, p. 547-550, 1989.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 81-87, 2000.

PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 31, n. 1, p. 20-31, 2011.

PATLE, S.; LAL, B. Investigation of the potential of agroindustrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 1, p. 569-602, 2008.

PELCZAR JR, M. et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª. ed., v. 1, São Paulo: Pearson, 1997, 556p.

PENTTILA, M. et al. Construction of brewer's yeasts secreting fungal endo- $\beta$ -glucanase. **Current Genetics**, v. 12, n. 6, p. 413-420, 1987.

PETERSSON, A. et al. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. **Yeast**, v. 23, n. 6, p. 455-464, 2006.

PIENKOS, P.; ZHANG, M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 743-762, 2009.

PORZIO, G. et al. Modelling lignocellulosic bioethanol from poplar: estimation of the level of process integration, yield and potential for co-products. **Journal of Cleaner Production**, v. 34, n. 1, p. 66-75, 2012.

PRETORIUS, I. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

RAABE, J. et al. Biocomposite of cassava starch reinforced with cellulose pulp fibers modified with deposition of silica (SiO<sub>2</sub>) nanoparticles. **J. Nanomaterials**, v. 2015, n. 1, p. 1-9, 2015.

RAMOS, L. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quím. Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

RAZMOVSKI, R.; VUČUROVIĆ, V. Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 48, n. 4-5, p. 378-385, 2011.

REN, X. et al. Anaerobic and sequential aerobic production of high-titer ethanol and single cell protein from NaOH-pretreated corn stover by a genome shuffling-modified *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Bioresource Technology**, v. 218, n. 1, p. 623-630, 2016.

RFA – RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Fueling a high octane future: 2016 Ethanol Industry Outlook**. Disponível em: <[http://ethanolrfa.org/wp-content/uploads/2016/02/\\_RFA\\_2016\\_full\\_final.pdf](http://ethanolrfa.org/wp-content/uploads/2016/02/_RFA_2016_full_final.pdf)> Acesso em: 22 mar. 2016.

RITTER, S. Lignocellulose: A Complex Biomaterial. **Chemical & Engineering News**, v. 86, n. 49, p. 1-15, 2008.

RIVADENEYRA-DOMÍNGUEZ, E. et al. Neurotoxic effect of linamarin in rats associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz) consumption. **Food Chem. Toxicol.**, v. 59, n. 1, p. 230-235, 2013.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. Glucose-sensing and signalling mechanisms in yeast. **FEMS Yeast Res.**, v. 2, n. 2, p. 183-201, 2002.

ROMANÍ, A. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 179, n. 1, p. 150-158, 2015.

ROMANO, P.; SUZZI, G.; VANNINI, L. Relationship between foaming and flocculence in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 2, n. 5, p. 511-515, 1994.

ROSSI, E. et al. Pré-Tratamentos na Produção de Etanol de Segunda Geração. **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 4, p. 3516-3522, 2014.

RUBIO-TEIXEIRA, M. et al. Lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *Kluyveromyces lactis* LAC genes. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 97-106, 2001.

SANCHEZ, Ó.; CARDONA, C. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANTOS, F. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SARAVANAKUMAR, K.; KATHIRESAN, K. Bioconversion of lignocellulosic waste to bioethanol by *Trichoderma* and yeast fermentation. **Journal list Biotech**. v. 4, n. 5, p. 493-499, 2014.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SASSNER, P. et al. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated salix at high dry-matter content. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 756-762, 2006.

SCORDIA, D. et al. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicelluloses hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, n. 1, p. 296-305, 2012.

SEAB – SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Análise da conjuntura agropecuária: Mandioca Safra 2014/2015**. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca\\_2014\\_15.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca_2014_15.pdf)>. Acesso em: 06 jul. 2016.

SENAC, T.; HAHN-HÄGERDAHL, B. Intermediary metabolite concentrations in xylulose and glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 1, p. 120-126, 1990.

SHAMA, I.; WASMA, A. Evaluation of the toxicity of *Manihot esculenta* of wistar rats after traditional sudanese processing. **J. Pharmacol. Toxicol.**, v. 6, n. 4, p. 418-426, 2011.

SHARMA, N. et al. Optimization of fermentation parameters for production of etanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 310-316, 2007.

SIMS, R. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1570-1580, 2010.

SILVA, J. P. A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrólise de palha de arroz**. 2007. 146f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

SIVAMANI, S.; BASKAR, R. Optimization of bioethanol production from cassava peel using statistical experimental design. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 34, n. 2, p. 567-574, 2015.

SOARES, E. et al. Carbohydrate carbon sources induce loss of flocculation of an ale-brewing yeast strain. **J. Appl. Microbiol.**, v. 96, n. 5, p. 1117-1123, 2004.

SOARES, E. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **J. Appl. Microbiol.**, v. 110, n. 1, p. 1-18, 2011.

SOARES, E.; MOTA, M. Quantification of yeast flocculation. **J. Inst. Brew.**, v. 103, n. 2, p. 93-98, 1997.

SOARES, E.; VROMAN, A. Effect of different starvation conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, n. 2, p. 325-330, 2003.

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, v. 160, n. 1, p. 61-68, 1945.

SORNYOTHA, S.; KIU, K.; RATANAKHANOKCHAI, K. An efficient treatment for detoxification process of cassava starch by plant cell-wall-degrading enzymes. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 109, n. 1, p. 9-14, 2010.

SOUZA, O. et al. Energia Alternativa de biomassa: Bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. **Rev. Bras. Eng. Agr. Amb.**, v. 16, n. 8, p. 915-921, 2012.

SOUZA, T. et al. Bolos sem glúten a base de arroz quebrado e casca de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 717-728, 2013.

SPEERS, R. et al. Effects of fermentation parameters and cell wall properties on yeast flocculation. **J. Inst. Brew.**, v. 112, n. 3, p. 246-254, 2006.

SRINORAKUTARA, T. et al. Approach of cassava waste pretreatments for fuel ethanol production in Thailand. **J. Sci. Res. Chula. Univ.** v. 31, n. 1, p. 77-84, 2008.

STAMBUK, B. et al. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **J. Sci. Ind. Res.**, v. 67, n. 11, p. 918-926, 2008.

STANLEY, D. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 109, n. 1, p. 13-24, 2010.

STEPHANOPOULOS, G.; ARISTIDOU, A.; NIELSEN, J. **Metabolic engineering**. Principles and methodologies. 1<sup>a</sup>. ed. California: Academic Press, 1998, 725p.

STEYN, A.; PRETORIUS, I. Co-expression of a *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase-encoding gene and a *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase-encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 100, p. 85-93, 1991.

STOCKER, M. Biofuels and biomass-to-liquids fuels in the biorefinery: catalytic conversion of lignocellulosic biomass using porous materials. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 47, n. 48, p. 9200-9211, 2008.

STRATFORD, M. Yeast flocculation: calcium specificity. **Yeast**, v. 5, n. 6, p. 487-496, 1989.

STRATFORD, M.; ASSINDER, S. Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. **Yeast**, v. 7, n. 6, p. 559-574, 1991.

SUBTIL, T.; BOLES, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 16, n. 5, p. 1-14, 2012.

SUN, J. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195-204, 2004.

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

SWINNEN, S. et al. Genetic determinants for enhanced glycerol growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 36, n. 1, p. 68-79, 2016.

TAHERZADEH, M. et al. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 87, n. 2, p. 169-174, 1999.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects. In: ASHOK, P. et al. **Biofuels**. 1<sup>a</sup>.ed. Amsterdam: Academic Press, 2011, p. 287-311.

TANAKA, K. et al. Enhancement of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the *HAA1* gene, encoding a transcriptional activator. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 22, p. 8161-8163, 2012.

TANI, T. et al. Isolation and characterization of xylitol-assimilating mutants of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 1389, n. 16, p. 30030-30035, 2016.

TANTIRUNGKIJ, M. et al. Fed-batch fermentation of xylose by a fast-growing mutant of xylose-assimilating recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 41, n. 1, p. 8-12, 1994.

TESFAW, A.; ASSEFA, F. Current trends in bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: substrate, inhibitor reduction, growth variables, coculture, and immobilization. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, n. 1, p.1-11, 2014.

TEWE, O. LYAYI, E. Cyanogenic glycosides. In: CHEEKE, P. **Toxicants of plant origin: Glycosides**. v. 2, Florida: CRS Press, 1989, p. 43-60.

TEERAPATR, S. et al. 2004. Utilization of waste from cassava starch plant for ethanol production. **Joint International Conference on "Sustainable Energy and Environment (SEE)"**, Hua Hin, Thailand.

TILMAN, D. et al. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Journal PNAS.**, v. 108, n. 50, p. 20260-20264, 2011.

TOKARNIA, C. et al. **Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção**. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012, 566p.

TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion. In: \_\_\_\_\_. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Madrid: Elsevier, 2011, p. 149-176.

TORGET, R.; HSU, TEH-AN. Two-temperature dilute acid prehydrolysis of hardwood xylan using a percolation process. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 45, n. 1, p. 5-22, 1994.

TRINCA, N. R.R. **Produção de bioetanol pelo consórcio com *Zymomonas mobilis* e *Candida tropicalis* em hidrolisado ácido da casca de soja (*Glycine max*)**. 2014. 106 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2014.

TUMWESIGYE, K. et al. Effective utilisation of cassava bio-wastes through integrated process design: a sustainable approach to indirect waste management. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 102, n. 1, p. 159-167, 2016.

TUMWESIGYE, K.; OLIVEIRA, J.; SOUSA-GALLAGHER, M. New sustainable approach to reduce cassava borne environmental waste and develop biodegradable materials for food packaging applications. **Food Packag. Shelf Life**, v. 7, n. 1, p. 8-19, 2016.

TWEYONGYERE, R.; KATONGOLE, I. Cyanogenic potential of cassava peels and their detoxification for utilization as livestock feed. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 366-369, 2002.

UBALUA, A. Cassava wastes: treatment options and value addition alternatives. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 18, p. 2065-2073, 2007.

VEIGA, J. et al. Characterization and productivity of cassava waste and its use as an energy source. **Renewable Energy**, v. 93, n. 1, p. 691-699, 2016.

VERSINO, F.; LÓPEZ, O.; GARCÍA, M. Sustainable use of cassava (*Manihot esculenta*) roots as raw material for biocomposites development. **Ind. Crops Prod.**, v. 65, n. 1, p. 79-89, 2015.

VILELA, L. et al. Enhanced xylose fermentation and ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. **AMB Express**, v. 2015, n. 5, p. 16-23, 2015.

VILHALVA, D. et al. Secagem convencional de casca de mandioca proveniente de resíduos de indústria de amido. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 42, n. 3, p. 331-339, 2012.

VINCENT, S. et al. Comparison of melibiose utilizing baker's yeast strains produced by genetic engineering and classical breeding. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 28, n. 2, p. 148-152, 1999.

VIRUNANON, C. et al. Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminary step in bio-alcohols production from waste starchy resources. **Journal of Cleaner Production**, v. 39, n. 1, p. 273-279, 2013.

VOLSCHEK, H. et al. Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nat. Biotechnol.**, v. 15, n. 3, p. 253-257, 1997.

WADSKOG, I.; ADLER, L. Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. **Yeast stress response**. Berlin: Springer, 2003, p. 201-240.

WALKER, G. **Yeast Physiology and Biotechnology**. 1<sup>a</sup>. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1998, 362p.

WANG, X. et al. Metabolomic analysis reveals key metabolites related to the rapid adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple inhibitors of furfural, acetic acid, and phenol. **OMICS**, v. 17, n. 3, p. 150-159, 2013.

WATANABE, S. et al. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. **Microbiology**, v. 153, n. 9, p. 3044-3054, 2007.

WEBER, C. et al. Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, n. 4, p. 1303-1315, 2010.

WEIGERT, B. et al. Influence of furfural on the aerobic growth of the yeast *Pichia stipitis*. **Biotechnol. Lett.**, v. 10, n. 12, p. 895-900, 1988.

WESTMAN, J. et al. Flocculation causes inhibitor tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* for second generation bioethanol production. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 80, n. 22, p. 6908-6918, 2014.

WILLIAMS, N. Yeast Genome Sequence Ferments New Research. **Science**, v. 272, n. 5261, p. 481-497, 1996.

WISSELINK, H. et al. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 4, p. 907-914, 2009.

YAMAKAWA, SYUN-ICHI. et al. Repeated fermentation from raw starch using *Saccharomyces cerevisiae* displaying both glucoamylase and  $\alpha$ -amylase. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 50, n. 6-7, p. 343-347, 2012.

YAMAOKA, C.; KURITA, O.; KUBO, T. Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures with *Kluyveromyces lactis* on high-sugar fermentation. **Microbiological Research**, v. 169, n. 12, p. 907-914, 2014.

YAMASHITA, Y. et al. Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*. **Biochem. Eng. J.**, v. 42, n. 3, p. 314-319, 2008.

YANG, KYUNG-MI. et al. Improving ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by overexpressing an ATP-binding cassette efflux pump. **Chem. Eng. Sci.**, v. 103, n. 1, p. 74-78, 2013.

YOSHIYAMA, Y. et al. Trehalose accumulation enhances tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to acetic acid. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 119, n. 2, p. 172-175, 2015.

ZHANG, M. et al. Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: Current status and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 215, n. 1, p. 50-62, 2016.

ZHANG, M. et al. Creation of an ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain by 266 nm laser radiation and repetitive cultivation. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 118, n. 5, p. 508-513, 2014.



ZHANG, W. et al. Isolation of xylose fermentation strains for ethanol production and xylose fermentation research. **Chem. Biochem. Eng. Q.**, v. 28, n. 1, p. 117-124, 2014.

ZHANG, W.; GENG, A. Improved ethanol production by a xylose-fermenting recombinant yeast strain constructed through a modified genome shuffling method. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 46, p. 1-11, 2012.

ZHANG, Y. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **J. Ind. Microbiol Biotechnol.**, v. 35, n. 5, p. 367-375, 2008.

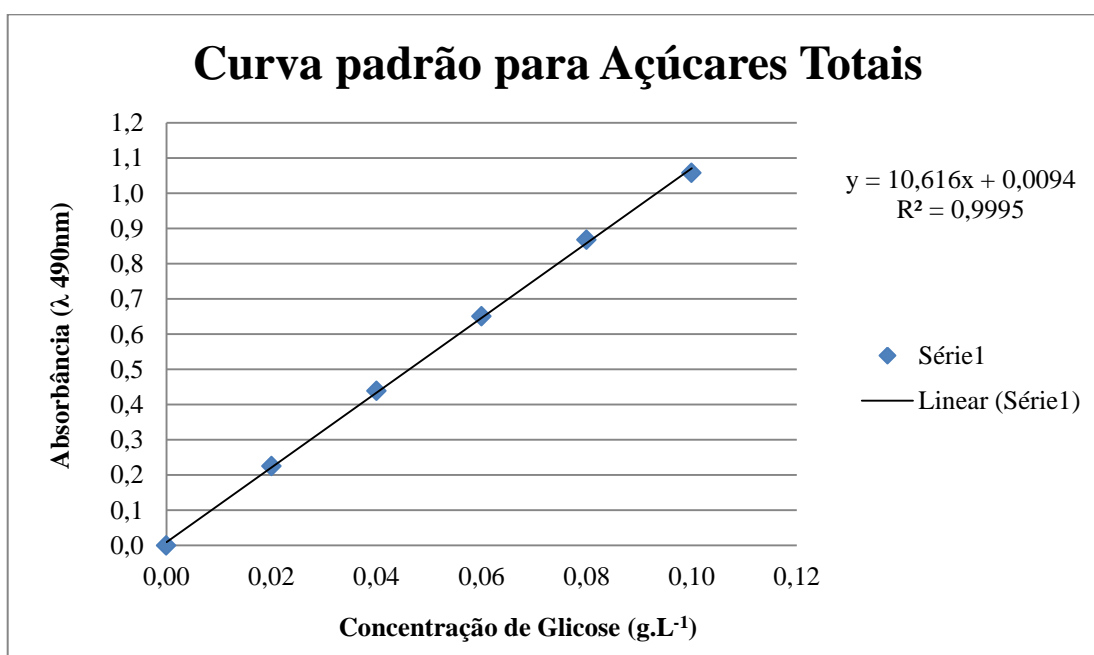
ZHAO, X.; BAI, F. Yeast flocculation: new story in fuel ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 849-856, 2009.

ZU, JIA-QING. et al. In situ detoxification of dry dilute acid pretreated corn stover by co-culture of xylose-utilizing and inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* increases ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 218, n. 1, p. 380-387, 2016.

## APÊNDICES

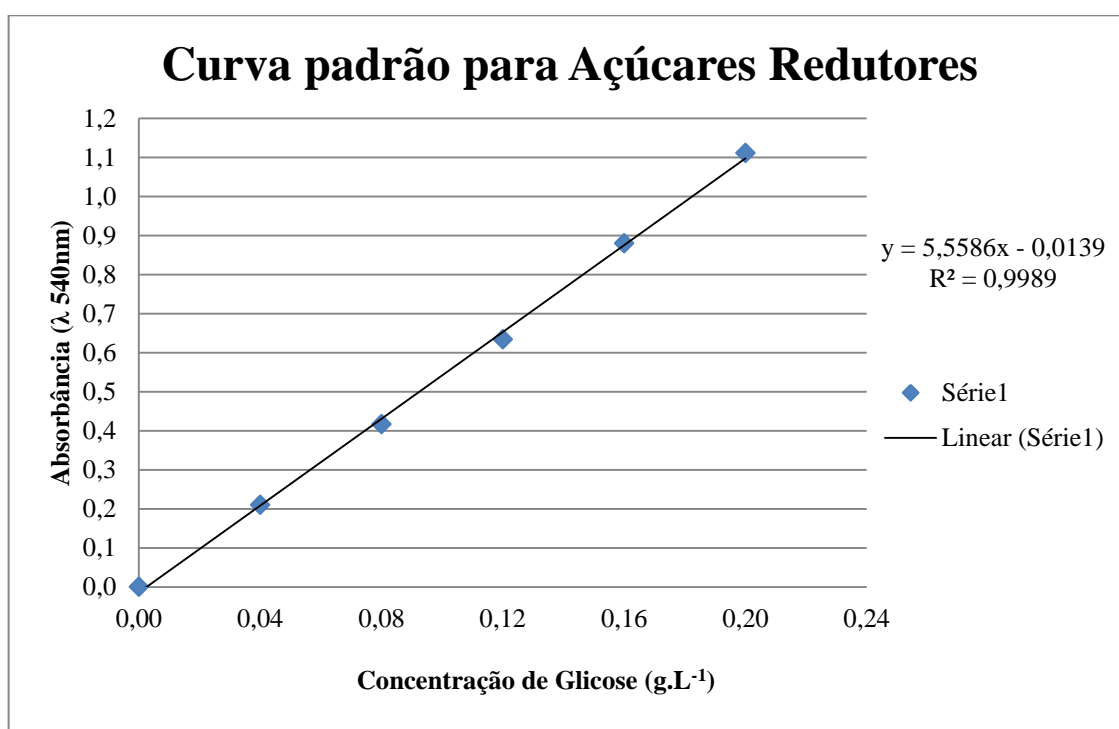
**Apêndice 1:** Concentração de glicose e absorvância (490 nm) para construção da curva padrão de açúcares totais.

| Concentração de glicose (g.L <sup>-1</sup> ) | Absorvância |
|--|-------------|
| 0,00   | 0           |
| 0,02   | 0,225       |
| 0,04   | 0,439       |
| 0,06   | 0,651       |
| 0,08   | 0,868       |
| 0,10   | 1,058       |



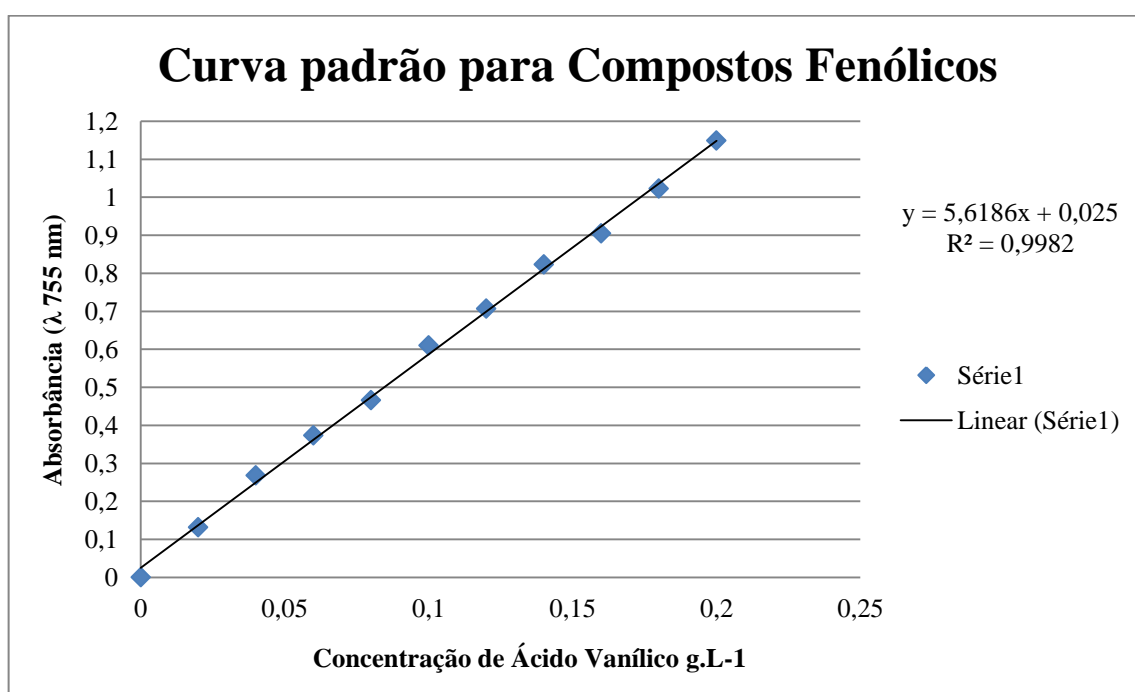
**Apêndice 2:** Concentração de glicose e absorvância (540 nm) para construção da curva padrão de açúcares redutores.

| Concentração de glicose (g.L <sup>-1</sup> ) | Absorvância |
|--|-------------|
| 0,000  | 0,000       |
| 0,040  | 0,210       |
| 0,080  | 0,417       |
| 0,120  | 0,634       |
| 0,160  | 0,880       |
| 0,200  | 1,111       |



**Apêndice 3:** Concentração de ácido vanílico e absorvância (755 nm) para padronização da curva padrão de compostos fenólicos.

| Concentração de ácido vanílico (g.L <sup>-1</sup> ) | Absorvância |
|---|-------------|
| 0   | 0           |
| 0,02  | 0,132       |
| 0,04  | 0,268       |
| 0,06  | 0,373       |
| 0,08  | 0,466       |
| 0,1   | 0,61        |
| 0,12  | 0,707       |
| 0,14  | 0,823       |
| 0,16  | 0,905       |
| 0,18  | 1,023       |
| 0,2   | 1,149       |



**Apêndice 4:** Padronização do Inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602.

Utilizou-se o meio caldo *Saccharomyces cerevisiae* (CSC) para o crescimento da levedura. Este procedimento foi realizado em três etapas, com intervalo de 24 horas e incubação a 30°C, que foram:

- Inoculou-se a levedura em 5 tubos de ensaio contendo 5 mL de CSC cada. A seguir os tubos foram vertidos em um erlenmeyer com 75 mL de CSC e, por último, todo o conteúdo do erlenmeyer foi passado para outro erlenmeyer com 150 mL de CSC.

Posterior a essas etapas, centrifugou-se o caldo do último erlenmeyer por 15 minutos a 3600 rpm e 25°C, a fim de se separar as células do CSC. O caldo foi desprezado e então adicionou-se água destilada esterilizada, para lavagem do “pellet” de células e retirar qualquer resíduo do CSC, e centrifugou-se novamente. A água remanescente foi descartada.

O “pellet” de células leveduriformes foi resuspendido em água destilada esterilizada e fizeram-se diluições; que por sua vez foram lidas em espectrofotômetro a 600nm. Separadamente, colocaram-se 50 mL das diluições em béqueres, previamente tarados em estufa a 105°C, e o conteúdo foi seco nesta temperatura por 24 horas. Foi realizada a pesagem até atingir peso constante no qual o béquer permaneceu em estufa a 105 °C por 1 hora entre as pesagens. Com os resultados de absorvância e peso seco das células foi construída uma curva padrão na qual a equação da curva obtida permitiu saber o inóculo inicial de cada fermentação.

**Apêndice 4.1:** Peso seco e absorvância (600 nm) de *Saccharomyces cerevisiae* para construção da curva padrão do crescimento celular

| <b>Peso seco (g)</b> | <b>Absorvância</b> |
|----------------------|--------------------|
| 0,07                 | 0,678              |
| 0,131                | 0,811              |
| 0,181                | 0,907              |
| 0,216                | 1,008              |
| 0,262                | 1,071              |
| 0,482                | 1,309              |
| 0,603                | 1,505              |
| 0,694                | 1,676              |
| 0,831                | 1,863              |
| 1,264                | 2,376              |

**Apêndice 4.2:** Curva padrão da biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, posterior a 24 horas de crescimento.

