

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA – CÂMPUS DE ARARAQUARA**

BRUNO VALENTE FRANCA

**Avaliação da relação C/N e adaptação da levedura *Rhodosporidium toruloides* em
hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar para a produção de
biolipídios**

Araraquara

2025

BRUNO VALENTE FRANCA

Avaliação da relação C/N e adaptação da levedura *Rhodosporidium toruloides* em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar para a produção de biolipídios

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Johana Dussán Medina.

Araraquara – SP

2025

F814a	<p data-bbox="438 1400 566 1422">Franca, Bruno</p> <p data-bbox="438 1433 1173 1534">Avaliação da relação C/N e adaptação da levedura <i>Rhodospiridium toruloides</i> em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar para a produção de biolipídios / Bruno Franca. -- Araraquara, 2025</p> <p data-bbox="454 1556 646 1579">80 p. : il., tabs., fotos</p> <p data-bbox="438 1635 1189 1702">Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Química) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara</p> <p data-bbox="454 1713 694 1736">Orientadora: Kelly Medina</p> <p data-bbox="438 1792 1117 1859">1. Biotecnologia. 2. Biolipídios. 3. Leveduras Oleaginosas. 4. Fermentações Microbianas. 5. Resíduos Lignocelulósicos. I. Título.</p>
-------	--

BRUNO VALENTE FRANCA

Avaliação da relação C/N e adaptação da levedura *Rhodospiridium toruloides* em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar para a produção de biolipídios

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Araraquara, 8 de dezembro de 2025.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Kelly Johana Dussán Medina
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dra. Debora Danielle Virginio da Silva
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. José Alberto Domingues Rodrigues
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em especial, à minha mãe, Simone, que sempre esteve ao meu lado em todas as etapas da minha vida. Por ter me criado sozinha, com amor, força e dedicação, sendo meu maior exemplo de coragem, determinação e perseverança.

Aos meus avós maternos, Cida e Jorge, por terem me dado todo apoio e suporte possível em minha trajetória.

Aos meus avós paternos, Itamar e Cecília, por toda inspiração e por me ensinarem desde cedo sobre a valorização e importância do estudo.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) por ter sido fundamental na minha formação acadêmica e pessoal, proporcionando aprendizado, oportunidades e experiências que contribuíram para meu crescimento profissional.

À minha orientadora, Kelly Medina, que me abriu as portas para pesquisa científica e me possibilitou desenvolvimento acadêmico e profissional.

À Sâmilla Gabriella, que me acompanhou durante toda a jornada de Iniciação Científica, que serviu como base para este trabalho.

À República Viracopos por ter sido meu lar por cinco anos em Araraquara. Lugar que se transformou em família e proporcionou amizade, apoio e memórias que levarei por toda a vida.

RESUMO

O aumento da escassez de fontes de energia não renováveis e os impactos ambientais associados reforçam a necessidade de alternativas sustentáveis. Nesse contexto, a biomassa do bagaço e palha de cana-de-açúcar surge como substrato promissor para a produção de produtos de alto valor agregado por microrganismos oleaginosos. O presente trabalho avaliou o uso da levedura *Rhodospordium toruloides* UFMG-CMY2781 na fermentação do hidrolisado hemicelulósico obtido a partir de mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1) visando produção de óleos microbianos. A caracterização da biomassa revelou composição de 35% celulose, 24% hemicelulose, 31% lignina, 5% de grupos acetil e 3% de cinzas. O hidrolisado hemicelulósico apresentou 26,3 g/L de xilose, 3,79 g/L de glicose, 3,59 g/L de arabinose e compostos inibidores provenientes do pré-tratamento ácido, sendo o ácido acético o principal (3,77 g/L). Para determinação da razão ótima C/N, foi aplicado um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} (total de 11 experimentos), avaliando ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio. A máxima concentração celular obtida foi de 2,45 g/L (C/N = 14), demonstrando que razões C/N mais elevadas favorecem o crescimento celular e o consumo de açúcares. A produtividade lipídica foi baixa (0,089 mg/L.h), indicando que o açúcar consumido foi destinado à manutenção celular. A levedura adaptada em hidrolisado concentrado três vezes (100% HHBCA 3X) apresentou crescimento de 5,2 g/L em 24 h, evidenciando resistência aos inibidores, embora o consumo de xilose ainda tenha sido limitado, com apenas 0,218%. Os resultados sugerem que a adaptação gradativa da levedura é uma estratégia promissora, sendo recomendada para futuros estudos de otimização da razão C/N, métodos de detoxificação e aprimoramento do pré-tratamento, visando maior produtividade de lipídios microbianos.

Palavras-chave: Biolipídios, hidrolisado hemicelulósico, leveduras oleaginosas, razão C/N, *Rhodospordium toruloides*.

ABSTRACT

The increasing scarcity of non-renewable energy sources and the associated environmental impacts reinforce the need for sustainable alternatives. In this context, sugarcane bagasse and straw biomass emerge as promising substrates for the production of high-value-added compounds by oleaginous microorganisms. This study evaluated the use of the yeast *Rhodospiridium toruloides* UFMG-CMY2781 in the fermentation of hemicellulosic hydrolysate obtained from a 1:1 mixture of sugarcane bagasse and straw, aiming at microbial oil production. Biomass characterization revealed 35% cellulose, 24% hemicellulose, 31% lignin, 5% acetyl groups, and 3% ash. The hemicellulosic hydrolysate contained 26.3 g/L xylose, 3.79 g/L glucose, 3.59 g/L arabinose, and inhibitory compounds from acid pretreatment, mainly acetic acid (3.77 g/L). To determine the optimal C/N ratio, a fractional factorial design 2^{4-1} (11 experiments) was applied, evaluating urea, yeast extract, peptone, and ammonium sulfate. The maximum cell concentration achieved was 2.45 g/L (C/N = 14), demonstrating that higher C/N ratios favor cell growth and sugar consumption. Lipid productivity was low (0.089 mg/L·h), indicating that most of the consumed sugar was directed toward cell maintenance. The yeast adapted to concentrated hydrolysate (100% HHBCA 3X) showed a cell growth of 5.2 g/L in 24 h, evidencing resistance to inhibitors, although xylose consumption remained limited (0.218%). The results suggest that gradual adaptation of the yeast is a promising strategy, and further optimization of the C/N ratio, detoxification methods, and pretreatment improvements are recommended to enhance microbial lipid productivity.

Keywords: Microbial lipids, hemicellulosic hydrolysate, oleaginous yeasts, C/N ratio, *Rhodospiridium toruloides*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Moagem anual de cana-de-açúcar no Brasil entre 2020/2021 e 2023/2024.	15
Figura 2. Estrutura molecular da celulose, hemicelulose e lignina	17
Figura 3. Organização da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular vegetal.....	18
Figura 4. Esquemática da ação do pré-tratamento ácido, alcalino e explosão a vapor em materiais lignocelulósicos.....	20
Figura 5. Ilustração do mecanismo da degradação da celulose em glicose através da atuação das enzimas endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidasas.	22
Figura 6. Rotas de degradação da celulose, hemicelulose e lignina em compostos inibidores após tratamento ácido por Ibraheem <i>et al.</i> (2013) ¹³	23
Figura 7. Rotas de degradação da celulose, hemicelulose e lignina em compostos inibidores após tratamento ácido por Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000) ¹⁴	23
Figura 8. Rota química de degradação de hexoses e pentoses em 5-hidroximetilfurfural e furfural por desidratação ácida.	25
Figura 9. Rota química de reidratação do 5-hidroximetilfurfural e síntese de ácido fórmico e ácido levulínico.....	25
Figura 10. Fases de crescimento celular em fermentações microbianas.	27
Figura 11. Formação de metabólitos primários e secundários ao decorrer de fermentações microbianas.....	29
Figura 12. <i>Rhodospiridium toruloides</i> dispostas em placas de Petri com ágar.	30
Figura 13. Glicólise, promovendo a formação do intermediário GA-3-P e piruvatos.	33
Figura 14. Via das pentoses fosfato, com a formação do intermediário GA-3-P.....	33
Figura 15. Rotas metabólicas resumidas de formação de triglicerídeos da <i>R. toruloides</i>	35
Figura 16. Rotas metabólicas completa de formação de triglicerídeos da <i>R. toruloides</i>	36
Figura 17. Imagem em microscópio do acúmulo lipídico da levedura oleaginosa <i>Rhodotorula glutinis</i>	37
Figura 18. Imagem de microscopia confocal de gotículas lipídicas coradas com Nile Red da levedura oleaginosa <i>Rhodotorula toruloides</i>	37
Figura 19. Representação do método de liquefação hidrotermal, com lise celular e extração de lipídios de leveduras oleaginosas.	38
Figura 20. Representação do método de extração de lipídios com clorofórmio e metanol.....	39
Figura 21. Representação da estrutura molecular de um triacilglicerol.	39

Figura 22. Representação da estrutura molecular dos ácidos graxos: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido α -linolênico.	40
Figura 23. Padrão de caracterização lipídica em HTLC. DG – Diglicerídeo, Erg – Ergosterol, OA – Ácido oleico, TG – Triacilglicerol, CF – Formiato de colesterol, CE – Éster de colesterol.	41
Figura 24. Reação química de transesterificação para a síntese de FAMES utilizando metanol.	42
Figura 25. Ácido docosahexaenoico, óleo microbiano comercializado pela DIC Corporation.	42
Figura 26. Balanço de massa da etapa de pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar utilizando ácido diluído.	54
Figura 27. Ensaios fermentativos da <i>Rhodosporidium toruloides</i> UFMG-CM-Y2781 em hidrolisado hemicelulósico após 96h de fermentação.	55
Figura 28. Concentração celular ao longo do tempo de fermentação para os experimentos: (a) 1 a 5 e (b) 6 a 11 do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	57
Figura 29. Diagrama de Pareto, resultante dos efeitos padronizados do modelo de regressão, para a avaliação das fontes de nitrogênio na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificar pela levedura <i>R. toruloides</i> UFMG-CMY2781, considerando as variáveis resposta: (a) Concentração Celular e (b) consumo de açúcares após 96h de fermentação.	58
Figura 30. Concentração celular da <i>R. toruloides</i> UFMG-CM-Y2781 para cada nível de adaptação usando HHBCA.	60
Figura 31. Células da levedura <i>Rhodosporidium toruloides</i> UFMG-CM-Y2781 no início da fermentação vistas em um microscópio com aumento de 100 vezes	62
Figura 32. Células da levedura <i>Rhodosporidium toruloides</i> UFMG-CM-Y2781 após 96 horas de fermentação vistas em um microscópio com aumento de 100 vezes.	62
Figura 33. Células da levedura <i>Rhodosporidium toruloides</i> UFMG-CM-Y2781 após 96 horas de fermentação vistas em um microscópio com aumento de 100 vezes	63
Figura 34. Crescimento celular da <i>R. toruloides</i> UFMG-CM-Y2781 adaptada e pH do meio fermentativo, coletados em triplicata, durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar duas vezes concentrado.	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Estrutura do trabalho	9
1.2 Contextualização e Justificativa.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Biomassa e resíduos lignocelulósicos	15
2.1.1 Biomassa da cana-de-açúcar e bagaço e palha de cana-de-açúcar como resíduos lignocelulósicos	15
2.1.2 Composição química de resíduos lignocelulósicos	16
2.2 Bioconversão de biomassas lignocelulósicas e panorama tecnológico.....	19
2.2.1 Métodos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.....	19
2.2.2 Formação de compostos inibidores durante pré-tratamento ácido.....	22
2.2.3 Fermentações microbianas em hidrolisado hemicelulósico.....	25
2.3 Leveduras oleaginosas: <i>Rhodosporidium toruloides</i>	29
2.3.1 Influência da relação C/N em fermentação da <i>Rhodosporidium toruloides</i> em hidrolisados hemicelulósicos.....	31
2.3.2 Rotas metabólicas de lipogênese da <i>Rhodosporidium toruloides</i>	32
2.4 Extração de lipídios microbianos	36
2.5 Composição e caracterização de lipídios microbianos da <i>Rhodosporidium toruloides</i>	39
2.6 Aplicações industriais de lipídios microbianos	42
3. OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo Geral	44
3.2 Objetivos Específicos	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Caracterização da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar	45
4.2 Pré-tratamento com hidrólise ácida e caracterização do hidrolisado hemicelulósico.....	45
4.3 Micro-organismo.....	46
4.4 Preparo do inóculo da levedura.....	46
4.5 Cultivo das leveduras em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de- açúcar: avaliação da relação C/N.....	47
4.6 Adaptação da levedura <i>R. toruloides</i> UFMG-CMY2781 ao hidrolisado 3 vezes concentrado e fermentação teste em hidrolisado 2 vezes concentrado.....	48
4.7 Quantificação dos lipídeos intracelulares.....	49
4.8 Análises da Estatística	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

5.1	Caracterização da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar e caracterização da celulignina obtida após o pré-tratamento.....	51
5.2	Caracterização do hidrolisado hemicelulósico	52
5.3	Balanço de massa do processo de pré-tratamento com ácido diluído	54
5.4	Planejamento experimental avaliando diferentes razões C/N na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificar.....	55
5.5	Extração dos lipídios microbianos referentes ao planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	59
5.6	Adaptação da levedura <i>R. toruloides</i> UFMG-CM-Y2781 em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar 3 vezes concentrado.....	60
5.7	Fermentação teste da adaptação da levedura <i>Rhodospordium toruloides</i> UFMG-CM-Y2781 realizada em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar duas vezes concentrado.	62
5.8	Perspectivas de melhoria	66
6.	CONCLUSÕES	68
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura do trabalho

Este trabalho está estruturado em seis capítulos, cada um abordando diferentes aspectos do estudo sobre a produção de lipídios microbianos através de fermentações com a levedura *Rhodospiridium toruloides* em hidrolisados hemicelulósicos de biomassa de cana-de-açúcar. O Capítulo 1 (Introdução) apresenta a contextualização do tema, destacando a importância da valorização de resíduos lignocelulósicos, como bagaço e palha de cana-de-açúcar, para a produção de bioprodutos de alto valor agregado, além dos objetivos gerais e específicos do trabalho.

O Capítulo 2 (Revisão Bibliográfica) aborda conceitos fundamentais e avanços tecnológicos relacionados ao tema. Inicialmente, discute-se a composição química da biomassa e dos resíduos lignocelulósicos, com enfoque no bagaço e na palha de cana-de-açúcar. Em seguida, são apresentados métodos de pré-tratamento da biomassa e a formação de compostos inibidores durante a hidrólise. O capítulo também detalha fermentações microbianas, incluindo fases de crescimento celular, produção de metabólitos associados e não associados à multiplicação celular, além de abordar o metabolismo lipogênico da *Rhodospiridium toruloides*. Por fim, são discutidos os métodos de extração de lipídios microbianos, sua caracterização química e suas aplicações industriais.

O Capítulo 3 (Objetivos) apresenta os objetivos gerais e específicos do estudo, indicando o foco na avaliação da relação C/N em fermentações de hidrolisados hemicelulósicos e na produção de lipídios pela levedura adaptada.

O Capítulo 4 (Material e Métodos) descreve detalhadamente os procedimentos experimentais adotados, incluindo a caracterização da biomassa de cana-de-açúcar, o pré-tratamento com hidrólise ácida, o preparo de pré-inóculos e inóculos, a condução das fermentações, a adaptação da levedura ao hidrolisado concentrado, a quantificação dos lipídios e a análise estatística dos dados.

O Capítulo 5 (Resultados e Discussão) apresenta os resultados obtidos ao longo do estudo, incluindo a caracterização da biomassa e do hidrolisado hemicelulósico, os efeitos das diferentes razões C/N sobre o crescimento e produção de lipídios, os resultados da adaptação da levedura e das fermentações teste, bem como a análise dos lipídios microbianos extraídos. Ao final, são discutidas as perspectivas de melhoria do processo estudado.

O Capítulo 6 (Conclusões) destaca os resultados mais relevantes relacionados à produção de lipídios microbianos em hidrolisados hemicelulósicos de cana-de-açúcar, a eficácia da adaptação da levedura e as implicações dos resultados para futuras aplicações industriais e pesquisas no campo de biotecnologia de leveduras oleaginosas.

1.2 Contextualização e Justificativa

Atualmente, a busca pela implementação de processos de produção de energia renovável é um dos maiores interesses da comunidade científica, visto sua importância na estabilização climática por meio da minimização dos efeitos do aquecimento global. Segundo o relatório State of the Global Climate 2024 da WMO, a temperatura média global no ano de 2023 foi $1,55 \pm 0,13$ °C acima dos níveis pré-industriais (1850-1900), e o nível médio do mar atingiu recorde, com uma taxa de elevação de 4,7 mm/ano entre 2015 e 2024¹. Tais estudos científicos demonstram a urgência de uma mudança do cenário energético mundial.

Segundo o Balanço Energético Nacional de 2025, elaborado pela Empresa de Pesquisa Energética (EPE) do Ministério de Minas e Energia, a matriz energética Brasileira, apesar de ser mais renovável que a matriz de geração de energia global (14,3% provinda de fontes renováveis no ano de 2022), ainda apresenta equilíbrio entre as fontes, sendo aproximadamente metade (50,0%) proveniente de fontes não renováveis². Dessa forma, visando uma maior sustentabilidade, urge que novas alternativas energéticas sejam exploradas pelo setor de geração de energia brasileiro.

Sob a atual problemática da matriz energética e suas consequências ao ambiente, a geração de energia por biomassa apresenta-se como uma alternativa renovável viável. A sua grande disponibilidade e variedade de matérias-primas, redução de poluição do ambiente comparado com fontes não renováveis, bom custo-benefício e a capacidade de produção de produtos de alto valor agregado justificam um maior investimento e pesquisa nesse ramo energético³.

A geração de energia por biomassa devido à sua abundância contrapõe-se com as fontes de energia não-renováveis devido a sua escassez e disponibilidade. Desse modo, a produção de energia provinda de biomassa é conseqüentemente menos custosa do que a geração de energia através do petróleo, por exemplo. Nesse contexto, pode-se citar os mais diversos resíduos agroindustriais que podem ser utilizados como matéria-prima no reaproveitamento da biomassa, como madeira, casca de amendoim, casca e borra de café, palha de arroz e bagaço e

palha de cana-de-açúcar³. Por exemplo, Cypriano *et al.* (2017)⁴ relataram a produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa residual da laranja.

Considerando o cenário brasileiro, a implementação da biomassa como fonte de energia demonstra-se ainda mais promissora, visto a dimensão do setor agrícola presente no país, sendo produtor de destaque de importantes *commodities*, como cana-de-açúcar, laranja, café e soja. Vale destacar as indústrias sucroalcooleiras no Brasil, difundidas em quase todas as regiões do país, com destaque no estado de São Paulo⁵. Sendo o maior produtor-exportador do complexo sucroalcooleiro, o Brasil possui imensurável potencial no reaproveitamento da biomassa residual gerada nesse processo produtivo⁵.

Do ponto de vista científico e socioambiental, a valorização de resíduos agroindustriais está alinhada com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável propostos pela Agenda 2030 da ONU, as quais visam conciliar crescimento econômico com inclusão social e proteção ambiental⁶. A temática de reaproveitamento de resíduos agroindustriais está diretamente relacionada com o ODS 7 (Energia Acessível e Limpa) uma vez que surge como alternativa sustentável às fontes fósseis. De forma análoga, o ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura) incentiva o desenvolvimento de tecnologias limpas e processos industriais mais eficientes, o que abrange a pesquisa e a inovação em bioprocessos e bioprodutos derivados de resíduos agroindustriais. Por fim, o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis) reforça a importância do uso racional dos recursos naturais e da redução de resíduos, princípios centrais da economia circular e da bioeconomia. Neste contexto, o presente trabalho contribui diretamente para o ODS 12 ao propor o reaproveitamento de resíduos lignocelulósicos da cana-de-açúcar (bagaço e palha) na produção de hidrolisados ricos em açúcares fermentáveis, transformando subprodutos industriais em lipídios microbianos de alto valor agregado. Dessa forma, promove-se a redução de resíduos, a valorização de materiais descartados e a eficiência no uso de recursos naturais, alinhando a pesquisa às metas de consumo e produção sustentáveis e reforçando os princípios de bioeconomia e circularidade^{6,7}.

Durante o beneficiamento da cana-de-açúcar no processo industrial de produção de açúcar e álcool, uma grande fração de biomassa é obtida, por exemplo, da palha durante a colheita e do bagaço durante a moagem dos colmos para obtenção do caldo^{8,9}. Esses subprodutos normalmente são utilizados na geração de vapor através do processo de combustão e posterior conversão em energia elétrica, que pode ser aproveitada dentro da planta industrial para o suprimento energético quanto para a distribuição de energia elétrica para as redes comerciais. Entretanto, o processo de combustão está associado a emissão de poluentes atmosféricos gasosos e particulados que geram grandes impactos ambientais e para a saúde

humana. Dessa forma, com o avanço das tecnologias de reaproveitamento de biomassa, como o fracionamento desses materiais lignocelulósicos para a obtenção de seus monômeros constituintes, torna-se possível a produção de compostos de alto valor agregado, ampliando e diversificando as cadeias produtivas das culturas agrícolas⁹.

O bagaço e a palha de cana-de-açúcar, assim como a maioria dos resíduos lignocelulósicos, tem sua composição formada majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina³, variando seu percentual considerando diferentes tipos de resíduos (bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo, madeira, resíduos florestais, entre outros)¹⁰. Geralmente, encontra-se a proporção de 40 a 50% de celulose, 25 a 30% hemicelulose e 15 a 20% de lignina³. Dessa forma, com o surgimento de diversas metodologias de pré-tratamento, permitiu-se a separação desses três componentes, visando a obtenção de outros produtos como etanol de segunda geração, biodiesel, metano, xilitol, butano, lipídios e moléculas precursoras de diversos componentes de alto valor^{3,10}.

Para o aproveitamento dos monômeros de açúcares disponíveis na fração celulósica e hemicelulósica, faz-se necessário o emprego de etapas de pré-tratamento para o fracionamento da matriz lignocelulósica^{3,10}. A celulose é um polissacarídeo formado apenas por glicose, enquanto a hemicelulose tem diferentes monômeros como glicose, xilose e arabinose¹⁰. Nesse contexto, diversas formas de pré-tratamento foram desenvolvidas para obter essas pentoses e hexoses, visando a fermentação por microrganismos^{3,10,11}. A hemicelulose é a fração mais simples de ser separada por métodos de pré-tratamento, em razão do caráter amorfo do polissacarídeo¹².

Entre os métodos de fracionamento da hemicelulose, existem os pré-tratamentos químicos (pré-tratamento ácido e líquidos iônicos), físico-químicos (explosão a vapor, extração por amônia e água quente líquida) e biológicos. Em destaque, cabe-se ressaltar a hidrólise ácida, que envolve o uso de um ácido forte diluído (normalmente H₂SO₄) em temperaturas elevadas para quebrar a estrutura do material lignocelulósico, solubilizando a hemicelulose³. Este processo mostra-se promissor em razão de sua alta eficiência e relativo baixo período de reação. De fato, Souza *et al.* (2023)¹² estudaram o fracionamento da biomassa de abacaxi, laranja, abóbora, melão e maçã para obtenção de açúcares da fração hemicelulósica. As condições empregadas foram a adição de ácido sulfúrico 2% (m/v) por grama de resíduo em temperatura de 121 °C por 15 minutos de reação, que resultou em uma maior liberação de monômeros em comparação ao pré-tratamento de explosão a vapor em todos os resíduos lignocelulósicos utilizados. Por exemplo, o bagaço da laranja obteve 95,5 g/L de açúcares redutores pela hidrólise ácida e 18,8 g/L na explosão a vapor¹².

Dessa forma, um portfólio promissor para o aproveitamento de resíduos agroindustriais através da produção de hidrolisados de biomassa é a utilização destes meios ricos em açúcares de cinco e seis carbonos para fermentação com microrganismos^{10,11,13,14}. Entretanto, durante o pré-tratamento da biomassa, esses monossacarídeos podem degradar-se e originar compostos inibidores como ácido fórmico, furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), que comprometem o crescimento celular e reduzem a eficiência fermentativa.¹⁴ Diante desse desafio, a utilização de leveduras oleaginosas torna-se especialmente atrativa, pois essas espécies apresentam maior tolerância a tais inibidores e são capazes de metabolizar os monômeros liberados da fração hemicelulósica, inclusive pentoses, de forma eficiente.^{11,14}

A levedura do gênero *Rhodosporidium toruloides* mostra-se bastante eficaz na produção de óleos microbianos, destacando-se pelo seu alto acúmulo de lipídios (cerca de até 70% em relação ao seu peso seco) e a capacidade de multiplicar-se em meios com a presença de inibidores oriundos da degradação dos componentes da fração lignocelulósica^{11,13}. Além disso, cepas de *R. toruloides*, diferentemente de outras leveduras, são capazes de consumir pentoses, como xilose e arabinose (componentes majoritários da fração hemicelulósica), que normalmente não são metabolizados por outros microrganismos^{3,10,11,15}.

Ademais, os lipídios produzidos por origem microbiana assemelham-se com lipídios de origem vegetal¹⁵. Portanto, podem ser utilizados como matéria-prima na produção de biodiesel, uma vez que o processo produtivo industrial de biodiesel utiliza, majoritariamente, ácidos graxos de óleos vegetais através do processo de transesterificação. Desse modo, é possível que problemas de estoque de óleos vegetais ocorram em razão da competição com a indústria alimentícia vegetal, o que pode ser solucionado pela substituição desses óleos vegetais por óleos microbianos¹⁵. Além disso, os lipídios microbianos podem ser utilizados na produção de emulsificantes, cosméticos, plásticos biodegradáveis e fungicidas, além de outros derivados oleoquímicos¹⁵.

Um aspecto para a viabilização da produção em larga escala de lipídios microbianos é a determinação das melhores condições do meio de cultivo da fermentação. Nesse viés, a razão molar entre as fontes de carbono e nitrogênio (relação C/N) adicionadas durante os ensaios fermentativos da levedura *R. toruloides* é um dos fatores determinantes para a quantidade de lipídios acumulados intracelularmente ao fim do processo¹⁶. Desse modo, sabe-se que um meio de cultivo com uma fonte de carbono em excesso e uma fonte limitada de nitrogênio contribui para uma maior produção de lipídios em fermentações de leveduras oleaginosas¹⁷, o que é explicado em razão da produção de óleos microbianos ser um metabólito associado ao crescimento celular¹⁶.

A síntese dos óleos microbianos em microrganismos oleaginosos ocorre quando este encontra-se em uma situação de estresse nutricional acarretado pela baixa disponibilidade de nitrogênio, essencial para o crescimento celular bem como para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos¹⁸. Dessa forma, enquanto o crescimento celular está diretamente ligado à quantidade de fontes de carbono presentes no meio de cultivo (glicose, xilose, arabinose, entre outros açúcares), a lipogênese ocorre durante o período de limitação de nitrogênio (peptona, sulfato de amônio, ureia) após a fase estacionária de crescimento celular. Nesse contexto, diversos trabalhos acadêmicos aprofundaram-se no estudo da influência de diferentes razões C/N presentes no meio de cultivo de ensaios fermentativos de leveduras oleaginosas no acúmulo lipídico. Por exemplo, o trabalho realizado por Liu *et al.* (2020)¹⁵ demonstra que fermentações da leveduras *R. toruloides* em meios com baixa concentração de nitrogênio, maiores razões C/N, produzem crescimento celular favorável, além de também apresentarem uma maior concentração de lipídios.

Após o acúmulo intracelular de óleos microbianos, é necessário realizar a sua extração. Os lipídios produzidos durante o processo de fermentação podem ser extraídos através de prensagem ou extração por solvente, sendo o segundo amplamente empregado¹⁹. Esse último mostra-se bastante eficaz devido sua capacidade de dissolver os lipídios das células com a adição de um composto orgânico, normalmente clorofórmio^{19,20}. Para isso, após a moagem das células previamente secas em uma estufa, uma solução de metanol (fase polar) e clorofórmio (fase apolar) é adicionada junto às células. Dessa forma, em razão dos óleos microbianos terem maior afinidade química com o clorofórmio, eles se depositarão na fase orgânica, a qual é posteriormente filtrada, separada e aquecida para a obtenção dos lipídios.

Ante o exposto, este trabalho tem como objetivo realizar um estudo sobre as melhores condições fermentativas para a produção de óleos microbianos pela fermentação da *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 em hidrolisado hemicelulósico visando uma futura viabilidade da implementação desse processo em escala industrial, além de caracterizar a biomassa utilizada. Desse modo, o presente Trabalho de Conclusão de Curso mostra-se uma interessante abordagem na busca por novas formas de obter-se uma matriz energética mais limpa, buscando novas fontes renováveis de energia como o reaproveitamento da biomassa de materiais lignocelulósicos para a geração de biodiesel e a sintetização de compostos de alto valor agregado como cosméticos, emulsificantes, plásticos biodegradáveis e fungicidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

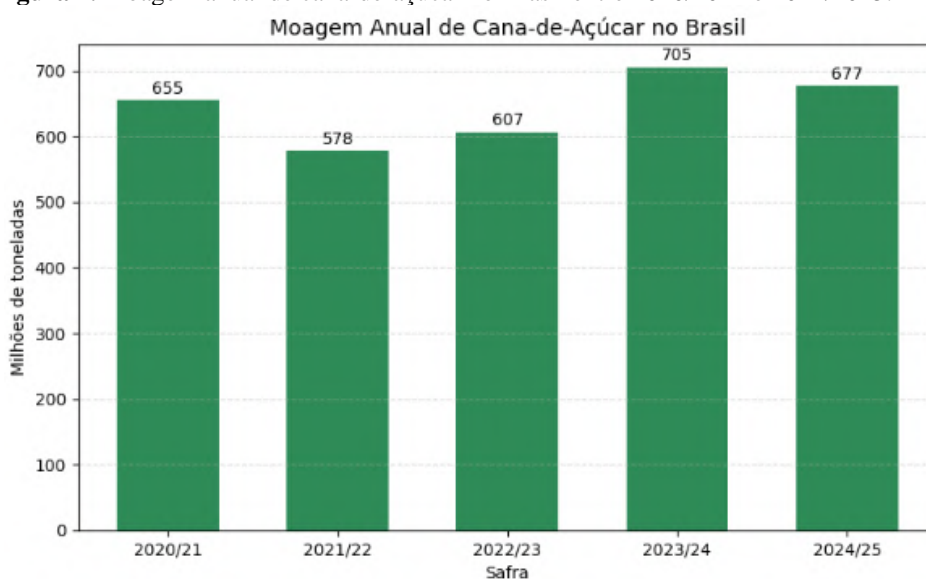
2.1 Biomassa e resíduos lignocelulósicos

2.1.1 Biomassa da cana-de-açúcar e bagaço e palha de cana-de-açúcar como resíduos lignocelulósicos

A biomassa refere-se a materiais orgânicos renováveis de origem biológica, que armazenam energia solar através do processo de fotossíntese e podem ser convertidos em biocombustíveis e bioenergia⁸. No contexto agroindustrial, os resíduos lignocelulósicos como bagaço e palha da cana-de-açúcar, cascas, sabugos e palhas de cereais destacam-se por sua elevada disponibilidade e composição rica em açúcares. Esses resíduos são tradicionalmente subutilizados, mas possuem alto potencial de aproveitamento energético e biotecnológico^{4,5}.

No cenário brasileiro, dois dos principais resíduos lignocelulósicos são o bagaço e a palha da cana-de-açúcar. Durante a safra 2024/25, o Brasil teve uma moagem de cerca de 677 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, mantendo-se como o principal produtor mundial²¹. A Figura 1 ilustra a moagem anual de cana-de-açúcar no Brasil nos últimos quatro anos. Segundo o Laboratório Nacional de Biorrenováveis, essa grande escala de produção tem como potencial a geração de um volume de mais de 160 milhões de toneladas de bagaço anualmente²².

Figura 1. Moagem anual de cana-de-açúcar no Brasil entre 2020/2021 e 2024/2025.



Fonte: Adaptado de United States Department of Agriculture (2025)²¹.

As usinas de beneficiamento de cana-de-açúcar para produção de açúcar e álcool utilizam o bagaço gerado durante o processo produtivo para produção de vapor em caldeiras à

combustão, o qual é consumido durante as operações industriais e para geração de energia elétrica, utilizada internamente e para exportação^{9,23}. Essa estrutura, além de estar relacionada com a emissão de poluentes atmosféricos como abordado na introdução deste trabalho, gera um excedente de bagaço. Para cada tonelada de cana moída, cerca de 250 a 280 kg de bagaço são gerados²⁴. É comum, via de regra, que sobre um volume considerável de bagaço após o fim da operação de uma usina sucroalcooleira durante uma safra, sendo necessário estocar apenas uma parcela para garantir o início da operação na safra seguinte²³. Ademais, devido à sua alta umidade e suscetibilidade à decomposição biológica, o armazenamento prolongado pode ocasionar perdas de massa e de poder calorífico, além de riscos de fermentação e incêndio espontâneo, o que incentiva a busca por alternativas de aproveitamento mais eficientes²⁵.

Dessa forma, o estudo de novas formas de reaproveitamento mostra-se ainda mais promissor, permitindo novas tecnologias sem comprometer a operação das usinas de açúcar e álcool. Atualmente, entre os principais usos para o bagaço de cana-de-açúcar excedente destaca-se a fabricação de papel, substituindo fibras vegetais e contribuindo para a redução do desmatamento²⁶. Outra forma de aproveitamento promissora é o reaproveitamento da fração lignocelulósica do bagaço por meio de processos biotecnológicos de fermentação, os quais possibilitam a conversão dos açúcares estruturais (celulose e hemicelulose) em biocombustíveis e bioprodutos de alto valor agregado, como o etanol de segunda geração (E2G) e biolipídios, o qual é cerne deste Trabalho de Conclusão de Curso. Nessa rota, o bagaço passa por etapas de pré-tratamento e fermentação. Esse tipo de aplicação tem sido amplamente estudado no contexto da bioeconomia, representando uma alternativa sustentável e economicamente viável para o setor sucroenergético^{3,10}. No caso da produção de etanol de segunda geração (E2G), já existe aplicação em escala industrial, sendo o Brasil um dos líderes globais nesse segmento. Em 2024, a Raízen, maior empresa produtora de açúcar e etanol do mundo, inaugurou a maior unidade produtiva de etanol de segunda geração na Usina Bonfim, em Guariba- SP, com capacidade anual de cerca de 82 milhões de litros de E2G²⁷.

2.1.2 Composição química de resíduos lignocelulósicos

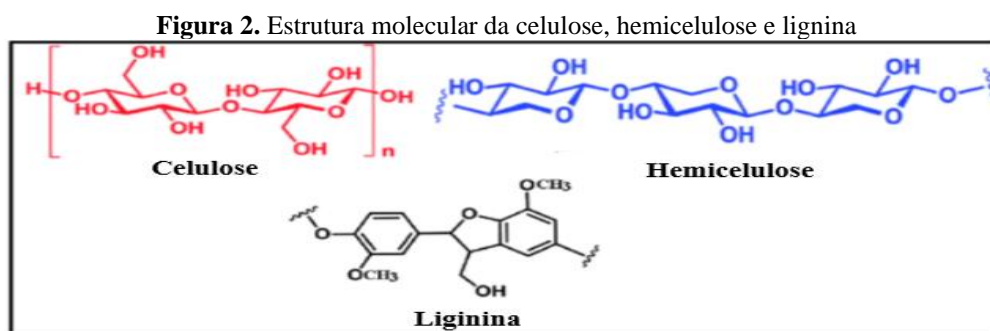
Os resíduos lignocelulósicos tem sua composição constituída por celulose, hemicelulose e lignina, além de cinzas e extrativos, com suas proporções variando de acordo com a matéria-prima. A Tabela 1 ilustra a composição química de diferentes materiais lignocelulósicos. A celulose é um polímero linear de glicose que representa geralmente entre 40 e 50 % da biomassa lignocelulósica, sendo a principal fonte de açúcares fermentáveis^{3,10}. A hemicelulose é uma

mistura heterogênea de polímeros de pentoses e hexoses presente em 25 a 30 % da biomassa e que pode ser convertida em açúcares fermentáveis após pré-tratamentos adequados³. A lignina, que representa entre 15 e 20 % da composição, é um polímero aromático complexo que confere rigidez e proteção contra degradação microbiana, sendo mais resistente à conversão biotecnológica^{3,10}. A Figura 2 ilustra a estrutura molecular desses compostos.

Tabela 1. Composição de materiais lignocelulósicos para diferentes matérias-primas.

Matéria-prima	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Madeiras	45 ± 2	30 ± 5	20 ± 4
Colmo de Milho	39–47	26–31	3–5
Palha de Milho	38–40	28	7–21
Palha de Arroz	28–36	23–28	12–14
Palha de Trigo	33–38	26–32	17–19
Palha de Cevada	31–45	27–38	14–19
Bagaço de Cana-de-Açúcar	32–48	19–24	23–32

Fonte. Adaptado e traduzido de Reddy e Yang (2005)²⁸ e Saini *et al.* (2015)²⁹.



Fonte. Adaptado de Abutaleb *et al.* (2019)³⁰.

Para melhor compreensão da atuação desses três compostos, é necessário entender como a celulose, a hemicelulose e a lignina se organizam estruturalmente na parede celular das plantas. A parede celular é composta por microfibrilas de celulose envoltas em uma matriz complexa de hemicelulose e lignina, o que lhe confere grande rigidez e resistência à degradação química e enzimática^{10,29}. A celulose é formada por longas cadeias lineares de β -D-glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas que se associam entre si por extensas pontes de hidrogênio e formam um composto de caráter cristalino, ou seja, cadeias altamente compactadas e alinhadas entre si. Essa estrutura fornece alta resistência mecânica e insolubilidade à água, o que dificulta a ação de solventes e de enzimas^{10,29}. Essa característica é uma das principais

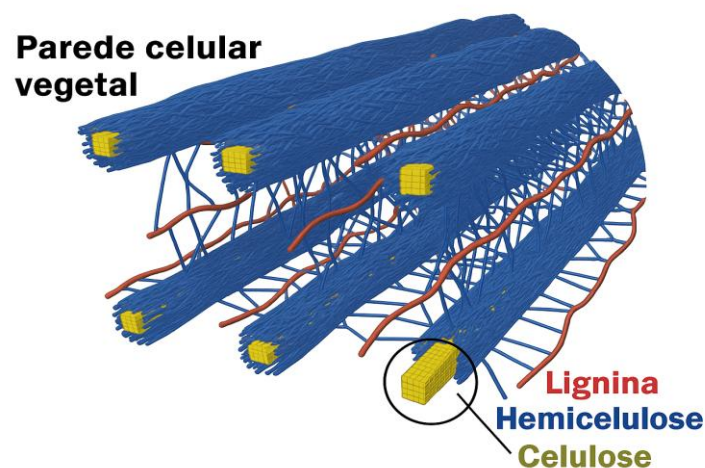
causas da recalcitrância de materiais lignocelulósicos, termo que indica a resistência da biomassa degradar-se em seus monômeros constituintes de forma química, enzimática ou biológica^{10,12,29}.

A hemicelulose é constituída por polissacarídeos ramificados como xilose, manose, arabinose e galactoses¹⁰. Em contrapartida à celulose, apresenta menor grau de polimerização e estrutura amorfa, o que facilita a sua hidrólise por métodos de pré-tratamento^{3,10,11}. As cadeias de hemicelulose na parede celular encontram-se envoltas nas estruturas de celulose e permitem a ancoragem entre as microfibrilas de celulose e a lignina, configurando coesão e flexibilidade à parede celular^{10,12,29}.

A lignina, por sua vez, é um polímero tridimensional complexo formado principalmente por unidades fenólicas que se entrelaçam e preenchem os espaços entre as microfibrilas de celulose e a matriz de hemicelulose^{10,29}. Sua presença confere rigidez estrutural, impermeabilidade e resistência contra ataques microbianos e enzimáticos, além de ser o principal fator de recalcitrância da biomassa, dificultando a degradação enzimática e química dos polissacarídeos^{10,12}. Em suma, a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos se dá principalmente devido à cristalinidade da celulose e à presença de lignina, enquanto a matriz amorfa e ramificada da hemicelulose apresenta menor resistência, tornando-se mais acessível à ação de enzimas e reagentes químicos^{10,12,29}.

A Figura 3 ilustra a organização da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular de materiais lignocelulósicos.

Figura 3. Organização da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular vegetal.



Fonte. Adaptado de Viamajala et al. (2010)³¹.

2.2 Bioconversão de biomassas lignocelulósicas e panorama tecnológico

2.2.1 Métodos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

O pré-tratamento é uma das etapas mais críticas no aproveitamento de biomassa lignocelulósica, sendo responsável por romper a estrutura da parede celular vegetal, composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina. Como citado no capítulo anterior, essa estrutura confere à biomassa uma resistência natural à degradação enzimática e química, descrita como recalcitrância lignocelulósica^{10,12,29}. Dessa forma, o objetivo principal do pré-tratamento é aumentar a acessibilidade da celulose e da hemicelulose às enzimas ou microrganismos, promovendo maior liberação de açúcares fermentescíveis e, conseqüentemente, maior eficiência na bioconversão durante a fermentação^{3,10,12,29}.

Entre os principais métodos de fracionamento da hemicelulose, estão os pré-tratamentos químicos (pré-tratamento ácido e alcalino), físico-químicos (explosão a vapor) e biológicos³.

O pré-tratamento ácido é amplamente utilizado devido sua eficiência em solubilizar a hemicelulose e, conseqüentemente, na liberação de pentoses e hexoses para fermentações microbiológicas^{10,12}. Nesse processo, normalmente utiliza-se ácido sulfúrico diluído entre 0,5% a 2,0% (m/v) em temperaturas entre 120 °C e 190 °C em tempos de reação curtos, entre minutos até uma hora. Essa condição promove a hidrólise das ligações glicosídicas da hemicelulose, rompendo sua estrutura amorfa e liberando açúcares monoméricos que posteriormente poderão ser utilizados em processos fermentativos^{3,10,11,13,14}. Além da dissolução da hemicelulose, o tratamento ácido permite a recolocação e condensação da lignina na parede celular, efeito que também contribui para a diminuição da recalcitrância lignocelulósica³². Contudo, o processo também pode gerar compostos inibidores como furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácidos orgânicos e fenóis decorrentes da degradação parcial de açúcares e lignina, o que exige etapas subsequentes de destoxificação antes da fermentação^{3,10,12}.

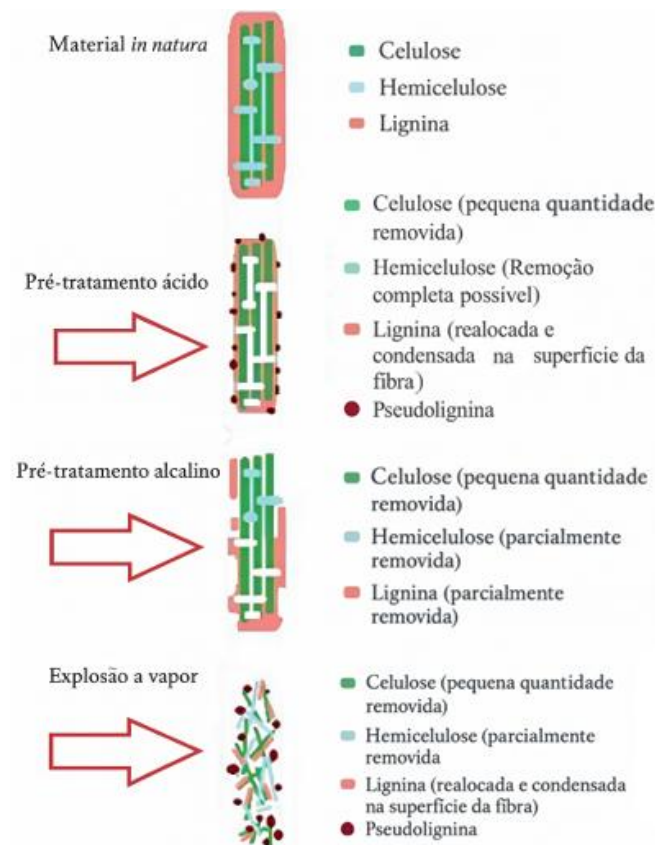
O método de fracionamento por pré-tratamento alcalino atua na remoção da lignina e desestruturação parcial da hemicelulose através da aplicação de uma base forte como hidróxido de sódio, amônia ou hidróxido de cálcio por horas ou dias. Dessa forma, diminui-se a recalcitrância do material lignocelulósico, aumentando a porosidade da parede celular e permitindo maior acessibilidade aos açúcares, os quais podem ser aproveitados em um pré-tratamento enzimático posterior^{33,34}. Em razão do método utilizar temperaturas mais amenas, entre 60 °C e 120°C a degradação da celulose, hemicelulose e lignina em compostos inibidores é menos acentuada³⁵. Além disso, o método é considerado de menor custo operacional e

apresenta menor corrosividade em relação aos tratamentos ácidos, o que o torna atrativo em escala industrial³⁴.

O método por explosão a vapor atua na desestruturação da parede celular e no aumento da acessibilidade da celulose e hemicelulose para enzimas hidrolíticas. Neste processo, a biomassa é exposta a vapor saturado de água sob alta pressão, entre 1,5 e 3,5 MPa, e temperaturas de 160 a 260 °C por períodos curtos, seguida de uma rápida descompressão³⁶⁻³⁸. Durante a explosão a vapor, ocorre uma expansão abrupta da parede celular, rompendo as ligações entre celulose, hemicelulose e lignina, com solubilização parcial da hemicelulose e fragmentação da lignina, ampliando a superfície disponível da celulose, o que facilita a ação das enzimas durante uma hidrólise enzimática posterior. Além disso, o método reduz a recalcitrância da biomassa sem necessidade de adição de produtos químicos agressivos, sendo considerado mais sustentável do que pré-tratamentos químicos ácidos ou alcalinos³⁶⁻³⁸.

O trabalho de Shimizu (2018)³⁵ ilustra a ação dos de pré-tratamentos ácido, alcalino e explosão a vapor sobre a biomassa lignocelulósica (Figura 4).

Figura 4. Esquematização da ação do pré-tratamento ácido, alcalino e explosão a vapor em materiais lignocelulósicos.

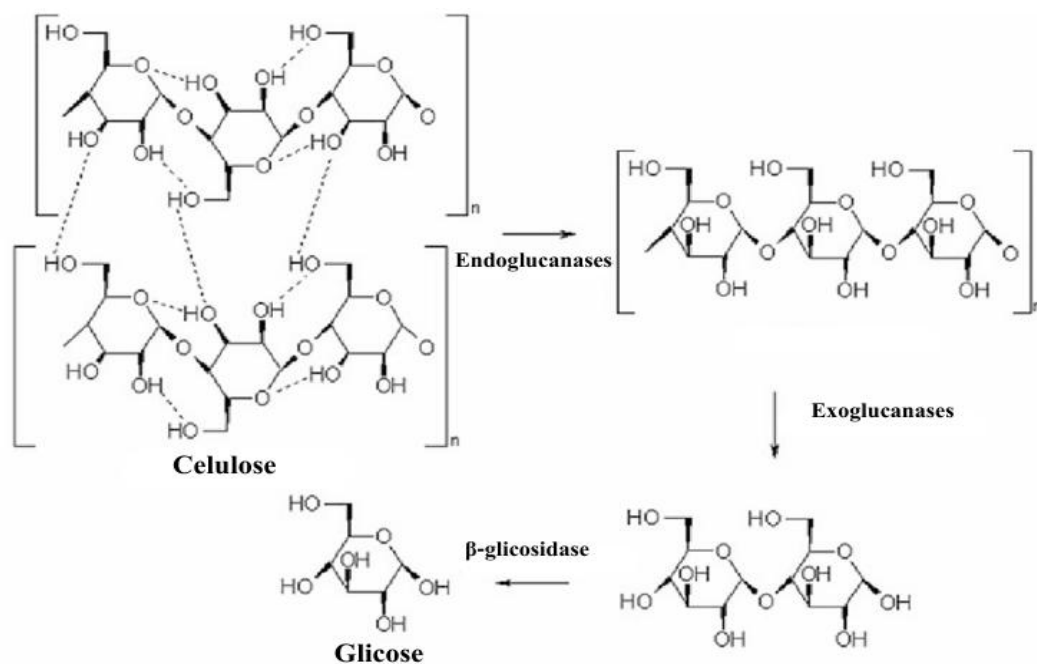


Fonte. Adaptado de Shimizu (2018)³⁵.

O pré-tratamento por água quente líquida é um método no qual a biomassa lignocelulósica é submetida a água sob alta pressão e temperaturas elevadas, geralmente entre 160 °C e 240 °C, mantendo-se no estado líquido e sem utilização de aditivos químicos ou rápida descompressão, como ocorre na explosão a vapor^{39,40}. Este processo promove a remoção parcial da hemicelulose, alterações estruturais na lignina e maior acessibilidade da celulose à ação de uma hidrólise enzimática³⁹. Comparado a pré-tratamentos ácidos, o método de fracionamento por água quente líquida apresenta menor formação de açúcares monossacarídeos degradados e compostos inibidores, como furfural e hidroximetilfurfural, favorecendo fermentações microbianas posteriores⁴⁰.

A hidrólise enzimática é a etapa em que as microfibrilas de celulose são degradadas em monossacarídeos fermentáveis por meio da ação de enzimas específicas. Esse processo é realizado após um pré-tratamento químico ou físico, como os abordados anteriormente, em razão da diminuição da recalcitrância da biomassa e aumento da exposição e acessibilidade da celulose. Entre as enzimas utilizadas nesse método, temos as celulases: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases⁴¹. As endoglucanases rompem as ligações β -1,4-glicosídicas em regiões amorfas da celulose, criando novas extremidades livres e aumentando a superfície disponível. As exoglucanases atuam nas extremidades das cadeias de celulose, liberando cellobioses, que são dissacarídeos de glicose. Por fim, as β -glicosidases convertem a cellobiose em monômeros de glicose⁴¹. A Figura 5 ilustra o mecanismo de ação das enzimas celulases na degradação da celulose em glicose. O emprego da hidrólise enzimática ocorre em condições suaves de temperatura e pH, preservando a integridade dos açúcares liberados e reduzindo a formação de compostos inibidores. Por outro lado, o elevado custo das enzimas é um dos principais desafios para a viabilização industrial desse processo⁴².

Figura 5. Ilustração do mecanismo da degradação da celulose em glicose através da atuação das enzimas endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidasas.



Fonte. Adaptado de Kumar *et al.* (2019)⁴³.

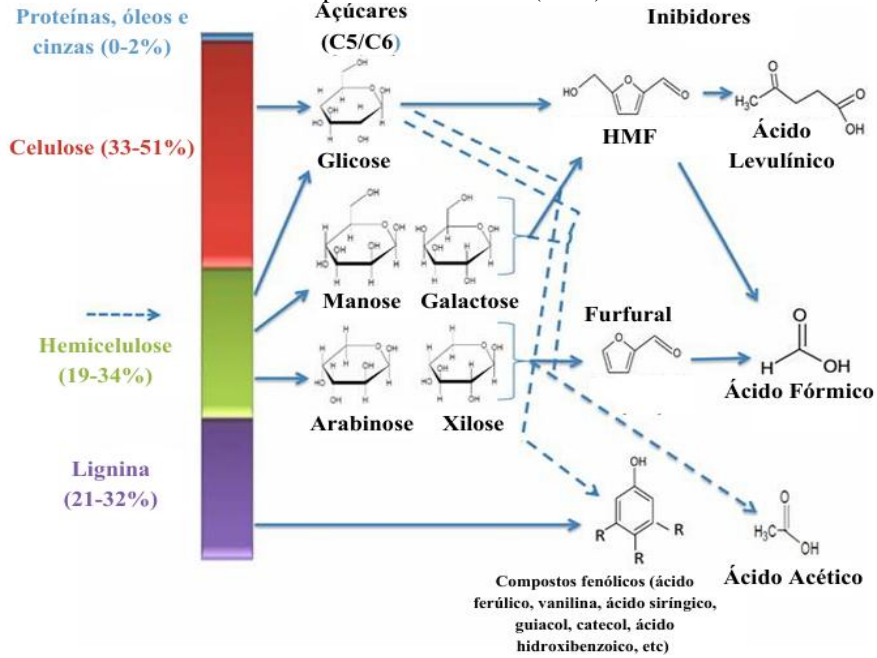
2.2.2 Formação de compostos inibidores durante pré-tratamento ácido

Durante o pré-tratamento ácido de biomassas lignocelulósicas, em razão da elevada temperatura e baixo pH, ocorre a formação de compostos que podem inibir os microrganismos durante a fermentação, reduzindo a produtividade do processo fermentativo. Entre os principais inibidores estão os ácidos fracos (como ácido acético, fórmico e levulínico), derivados de furano (como furfural e 5-hidroximetilfurfural) e compostos fenólicos, que resultam da degradação parcial da hemicelulose, celulose e lignina^{10,13,14}. Esses compostos interferem no metabolismo celular, retardando o crescimento de leveduras e outros microrganismos fermentativos, além de afetarem a utilização eficiente dos açúcares liberados nos hidrolisados^{13,14}. Por essa razão, estratégias de destoxificação do hidrolisado são frequentemente aplicadas antes da fermentação para minimizar o efeito dos inibidores e melhorar a produtividade microbiana^{13,14}. Além da destoxificação, também têm sido estudadas formas de aumentar a resistência dos microrganismos aos compostos inibitórios. A seleção ou adaptação de cepas mais tolerantes, assim como o uso de técnicas de engenharia genética e evolução adaptativa, tem se mostrado uma alternativa promissora. Essas abordagens buscam fortalecer os mecanismos naturais de defesa celular, como a manutenção do equilíbrio do pH interno, a integridade da membrana e a capacidade de degradação de compostos tóxicos. Com isso, é possível reduzir os efeitos

negativos dos inibidores e manter taxas de fermentação mais elevadas, tornando o processo mais estável e eficiente mesmo em condições mais severas¹³.

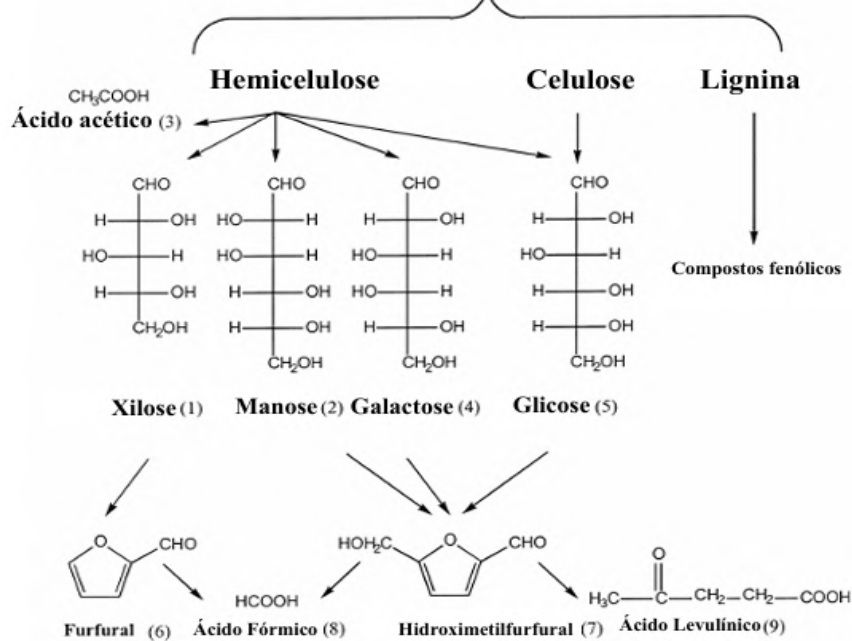
As rotas de degradação da celulose, hemicelulose e lignina estão ilustradas nas Figuras 6 e 7 e na Tabela 2.

Figura 6. Rotas de degradação da celulose, hemicelulose e lignina em compostos inibidores após tratamento ácido por Ibraheem *et al.* (2013)¹³.



Fonte. Adaptado de Ibraheem *et al* (2013)¹³.

Figura 7. Rotas de degradação da celulose, hemicelulose e lignina em compostos inibidores após tratamento ácido por Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000)¹⁴.



Fonte. Adaptado de Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000)¹⁴.

Tabela 2. Rotas de degradação da celulose, hemicelulose e lignina em compostos inibidores após tratamento ácido.

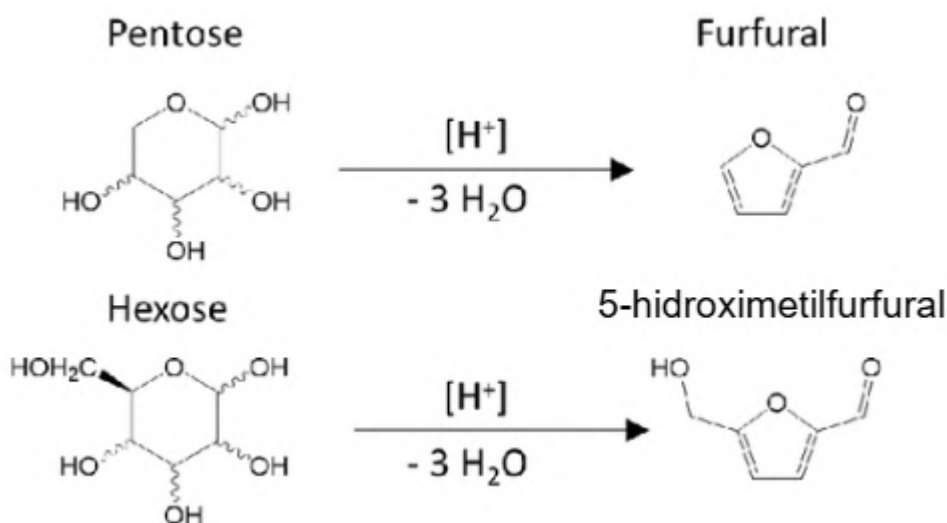
Fração Lignocelulósica	Monômero constituinte	Composto Inibidor
Celulose	Glicose	5-HMF
		Furfural
		Ácido Levulínico
		Ácido Fórmico
		Compostos Fenólicos*
Hemicelulose	Manose, Galactose Arabinose Xilose	5-HMF
		Furfural
		Ácido Fórmico
		Ácido Levulínico
		Ácido Acético
Lignina	-	Compostos Fenólicos

Fonte. Ibraheem *et al* (2013)¹³.

Os trabalhos de Ibraheem *et al* (2013)¹³ e Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000)¹⁴, diferem-se sobre a formação de ácido acético e compostos fenólicos através da degradação da celulose. Essa rota química não usual foi exposta apenas mais recentemente no trabalho de Ibraheem *et al* (2013)¹³.

A degradação dos açúcares em furfural e 5-hidroximetilfurfural pode ser descrita pela desidratação de pentoses e hexoses, catalisada por meio ácido e alta temperatura. Durante a reação, cada molécula de açúcar perde três moléculas de água, originando compostos de estrutura furânica, altamente reativos e inibitórios à atividade microbiana^{13,14,45}. A Figura 8 ilustra a rota química de degradação de pentoses e hexoses.

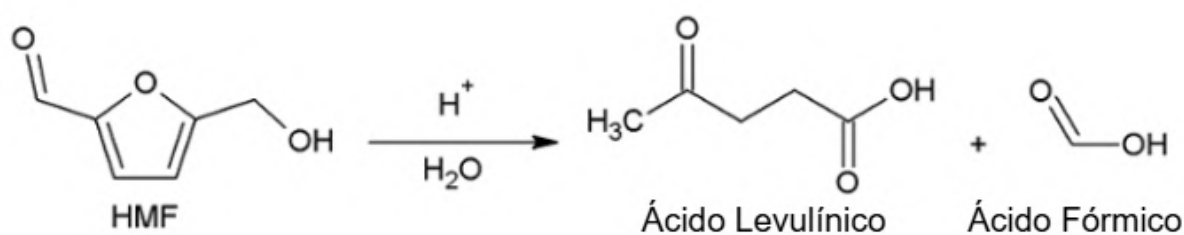
Figura 8. Rota química de degradação de hexoses e pentoses em 5-hidroxiacetilfurfural e furfural por desidratação ácida.



Fonte. Adaptado de Istasse e Richel (2021)⁴⁴.

Por sua vez, o HMF pode ser decomposto em ácido levulínico e ácido fórmico após reagir com uma molécula de água em meio ácido e alta temperatura. O processo de reidratação do HMF está ilustrado na Figura 9.

Figura 9. Rota química de reidratação do 5-hidroxiacetilfurfural e síntese de ácido fórmico e ácido levulínico.



Fonte. Adaptado de Fulignati *et al.* (2022)⁴⁵.

2.2.3 Fermentações microbianas em hidrolisado hemicelulósico

A fermentação microbiana de hidrolisados hemicelulósicos consiste em um processo no qual microrganismos utilizam os açúcares liberados após um pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para a conversão de produtos de interesse industrial. Esse processo ocorre em razão do funcionamento do metabolismo celular, que converte compostos orgânicos simples em metabólitos de valor agregado, como etanol, ácidos orgânicos, lipídios e outros bioprodutos^{10,11,13,14}. Os principais açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico e

utilizados durante a fermentação são as pentoses (como xilose, arabinose) e as hexoses (como glicose e manose), resultantes da degradação por pré-tratamento. Durante a fermentação, os açúcares são transportados para o interior da célula, onde ocorrem rotas metabólicas, sendo a glicólise a via pentose-fosfato as principais. Dessa forma, os monômeros são metabolizados para a síntese do produto desejado. Cabe-se citar etanol, xilitol, lipídios microbianos e ácidos orgânicos como possíveis metabólitos desse processo^{10,11,13,14}. Para a produção de etanol de segunda geração, utiliza-se as leveduras do gênero *Saccharomyces* devido à sua alta eficiência na fermentação de hexoses e tolerância ao etanol⁴⁶. Já na produção de xilitol, a levedura *Candida tropicalis*, é utilizada em razão de possuir a enzima xilose redutase, responsável pela conversão de xilose em xilitol⁴⁷. Por fim, para a produção de lipídios microbianos, cerne deste trabalho, destacam-se as leveduras *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides* devido sua elevada capacidade de conversão de açúcares em lipídios^{48,49}.

Entre os pontos que influenciam na eficiência de uma fermentação microbiana estão a disponibilidade de açúcares no hidrolisado, a presença residual de inibidores provindos do pré-tratamento, a relação entre a suplementação de fontes de carbono e nitrogênio e capacidade metabólica das cepas utilizadas^{13,14}.

2.2.3.1 Fases de crescimento celular em fermentações microbianas

O crescimento de microrganismos em processos fermentativos em cultivos em batelada pode ser representado pela curva de crescimento microbiano, a qual relaciona a concentração de biomassa com o tempo de cultivo. A análise do comportamento do crescimento celular ao decorrer de uma fermentação possibilita a compreensão da eficiência de diferentes condições do meio durante o cultivo fermentativo⁵⁰. O crescimento microbiano é dividido em quatro fases: fase de adaptação (lag), fase exponencial (logarítmica), fase estacionária e fase de declínio ou morte celular⁵⁰⁻⁵¹.

Na fase de adaptação (fase lag), as células recém-inoculadas passam por um período de ajuste às condições do meio, sem aumento expressivo da biomassa. Nessa etapa, as células sintetizam enzimas, ajustam rotas metabólicas e reparam estruturas celulares para se adequar à nova composição nutricional e às condições ambientais, como temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio⁵⁰⁻⁵¹.

Após o período de adaptação, inicia-se a fase exponencial ou logarítmica, caracterizada pelo crescimento máximo e constante das células. Nessa etapa, a taxa de crescimento atinge seu valor máximo, no qual o metabolismo celular está voltado principalmente para a biossíntese de

macromoléculas e divisão celular. Nesse momento, a disponibilidade de oxigênio e nutrientes favorece um crescimento mais acelerado, contribuindo para a obtenção de biomassa e para o início da formação de produtos metabólicos⁵⁰.

Com o decorrer da fermentação, ocorre a redução dos nutrientes essenciais e o cultivo entra na fase estacionária. Nesse ponto, a taxa de crescimento celular se equilibra com a taxa de morte, e a concentração de biomassa total tende à estabilidade⁵⁰⁻⁵¹. O metabolismo celular se adapta à limitação de nutrientes e ao acúmulo de subprodutos, direcionando a energia para a manutenção celular e para a produção de compostos secundários. Dessa forma, vias metabólicas visam a produção de metabólitos ao invés da multiplicação celular, contribuindo com a produção do composto de interesse industrial⁵²⁻⁵³. Em leveduras oleaginosas, como a *Rhodospiridium toruloides* por exemplo, a limitação de nitrogênio e o excesso de carbono induzem o redirecionamento metabólico para o acúmulo de lipídios intracelulares em vez de crescimento celular⁵⁴⁻⁵⁶. Dessa forma, mostra-se a importância do estudo de condições ótimas de suplementação de fontes de carbono e nitrogênio para a maximização da produção de óleos microbianos.

Por fim, o cultivo atinge a fase de declínio ou morte celular, na qual a disponibilidade de nutrientes se torna insuficiente e o acúmulo de compostos tóxicos e produtos metabólicos prejudica a viabilidade celular. A morte das células pode liberar substâncias que são eventualmente utilizadas por outras, mas a produtividade global do processo tende a diminuir⁵⁴⁻⁵⁶. A Figura 10 ilustra o comportamento do crescimento celular ao decorrer de uma fermentação microbiana.

Figura 10. Fases de crescimento celular em fermentações microbianas.



Fonte. Alterthum *et al.* (2001)⁵⁷.

2.2.3.2 Metabólitos associados e não associados à multiplicação celular

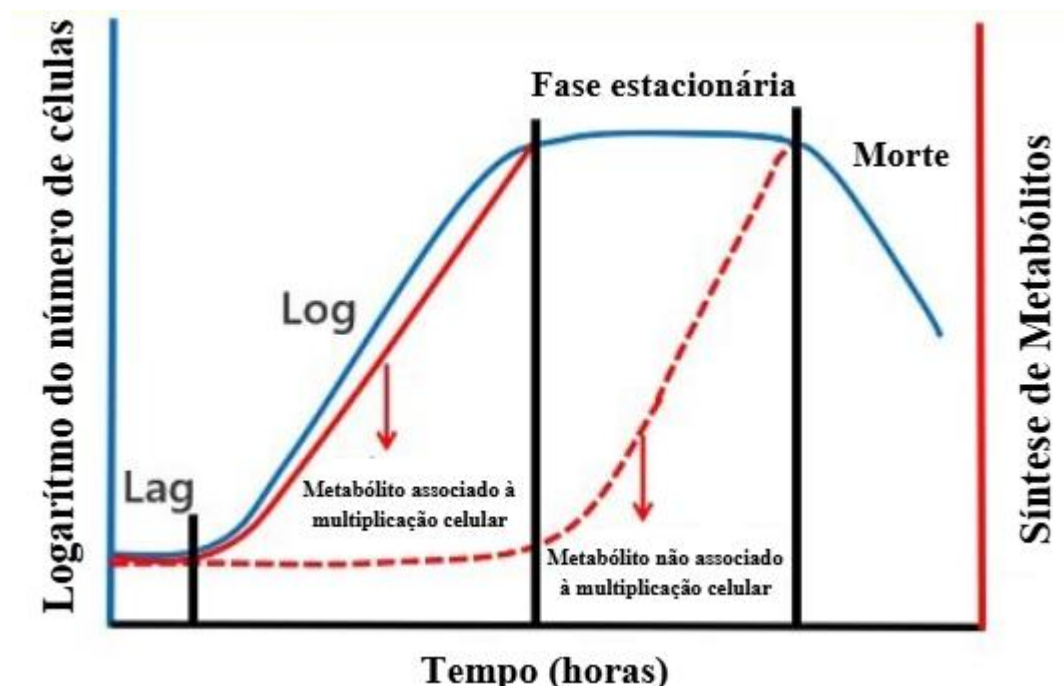
Como já abordado, os microrganismos produzem diversos tipos de metabólitos durante a fermentação microbiana, os quais podem ser classificados como associados ou não associados à multiplicação celular, dependendo de sua função biológica e do momento de síntese durante o ciclo de crescimento⁵⁸.

Metabólitos associados à multiplicação celular estão relacionados com o crescimento celular, formação de biomassa e manutenção do metabolismo básico. Entre eles destacam-se aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas e enzimas. Esses compostos são produzidos principalmente durante a fase exponencial, quando os microrganismos estão ativos na síntese de macromoléculas e na divisão celular. Por exemplo, em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, a produção de etanol durante fermentações alcoólicas é considerada um metabólito associado à multiplicação celular, pois está diretamente ligada à formação de biomassa⁵⁹. Outro exemplo é a produção de ácidos orgânicos, como ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus niger*, que ocorre simultaneamente ao crescimento ativo do microrganismo⁶⁰.

Em contrapartida, metabólitos não associados à multiplicação celular não são essenciais para a formação de biomassa, mas desempenham papéis importantes na adaptação, defesa e armazenamento de energia. Estes compostos são geralmente sintetizados durante a fase estacionária, quando há limitação de nutrientes e desaceleração do crescimento celular. Entre os principais exemplos de metabólitos não relacionados à formação de biomassa encontram-se antibióticos, pigmentos, toxinas e óleos microbianos⁶¹. Um exemplo de metabólito não associado à multiplicação celular ocorre em leveduras oleaginosas, como a *Rhodospiridium toruloides*, que acumulam grandes quantidades de lipídios intracelulares durante a fase estacionária, funcionando como reserva energética para períodos de estresse⁵⁴. Outro exemplo são os carotenóides produzidos pela mesma levedura, que atuam na proteção celular contra estresse oxidativo⁶².

A Figura 11 ilustra a formação de metabólitos associados e não associados à multiplicação celular em fermentações microbianas.

Figura 11. Formação de metabólitos associados e não associados à multiplicação celular ao decorrer de fermentações microbianas.



Fonte. Adaptado de Supriya (2025)⁶³.

2.3 Leveduras oleaginosas: *Rhodosporidium toruloides*

As leveduras oleaginosas constituem um grupo especializado de fungos unicelulares capazes de acumular internamente ácidos graxos e triacilgliceróis (TAGs) durante seu ciclo de crescimento, tipicamente em condições de excesso de carbono e limitação de nutrientes como nitrogênio ou fósforo⁵⁴⁻⁵⁵. Define-se que para uma levedura ser considerada oleaginosa a mesma deve acumular mais de 20% de lipídios em peso seco de sua biomassa durante uma fermentação, embora revisões recentes apontem que essa fronteira pode variar conforme espécie, condição de crescimento e tipo de lipídio acumulado⁶⁴.

Para esse acúmulo lipídico expressivo, essas leveduras utilizam variados substratos de carbono como hexoses, pentoses, ácidos orgânicos e glicerol⁶⁵. A capacidade de metabolização de monossacarídeos traz grande potencial ao uso de leveduras oleaginosas em fermentações utilizando hidrolisados hemicelulósicos e o reaproveitamento de biomassa lignocelulósica^{11,14}.

Durante o processo de fermentação de leveduras oleaginosas, observa-se, geralmente, um crescimento celular acelerado quando há disponibilidade suficiente de nitrogênio ou de outro nutriente essencial no meio⁵⁴⁻⁵⁶. Após o consumo e esgotamento desse nutriente, ocorre uma transição metabólica, na qual o excesso de carbono é redirecionado para a síntese e acumulação de lipídios intracelulares. Esse fenômeno caracteriza-se como um comportamento

típico de metabólitos não associados à multiplicação celular, manifestando-se durante sua fase estacionária, como abordado anteriormente⁵⁴.

Diversas espécies de leveduras oleaginosas já foram identificadas e exploradas: entre elas *Yarrowia lipolytica*, *Lipomyces starkeyi*, *Cryptococcus curvatus* e *Rhodosporidium toruloides*, sendo esta última foco deste trabalho⁶⁶. A Figura 12 ilustra a *R. toruloides* inoculadas em placas de Petri com ágar.

Figura 12. *Rhodosporidium toruloides* dispostas em placas de Petri com ágar.



Fonte. Technische Universität München (2025)⁶⁷

No que se refere especificamente à *Rhodosporidium toruloides*, esta espécie surge como uma das mais promissoras entre as leveduras oleaginosas, pelas suas características biológicas, metabólicas e de aplicação tecnológica. Tal levedura tem demonstrado capacidade de acumular lipídios com porcentagem superiores a 70% em relação ao seu peso seco¹¹. De forma simultânea, o microrganismo também produz carotenoides (como torularhodina, toruleno) que conferem coloração avermelhada às colônias, o que amplia sua utilidade industrial para além da produção de óleo microbianos⁶².

Além disso, *R. toruloides* mostra versatilidade no consumo de substratos, incluindo hexoses (glicose), pentoses (xilose) e ácidos orgânicos como acetato, o que a torna adequada para fermentações a partir de hidrolisados lignocelulósicos ou resíduos agroindustriais. Por exemplo, em cultivo com ácido acético como único carbono, esta espécie acumulou até 48,2% de lipídio (w/w) com C/N de 200⁶⁸.

Entre os diferenciais da *R. toruloides* cabe-se citar sua resistência à compostos inibidores degradados durante pré-tratamentos de fracionamento de biomassas lignocelulósicas. O trabalho de Saini *et al.* (2020)⁶⁹ observou elevado crescimento celular, até 19,56 g/L, acúmulo de lipídico de até 36,68% referente ao seu peso seco e consumo de 95% dos açúcares presentes

em hidrolisado hemicelulósico de madeira sem destoxificação e com presença de furfural (0,067 g/L) e HMF (0,025 g/L). Ademais, o potencial para engenharia metabólica com a identificação de genes que afetam o acúmulo de lipídios também é um diferencial. Coradetti *et al.* (2018)⁷⁰ observou mais de 150 genes que interferem diretamente no acúmulo lipídico da levedura. Por fim, o perfil de ácidos graxos majoritariamente composto por palmitato e oleato, os quais são semelhantes aos óleos vegetais convencionais, o que os tornam compatíveis com aplicações em biodiesel e oleoquímica⁷¹.

Em relação a *Rhodosporidium toruloides* UFMG-CM-Y27811, a cepa utilizada nesse Trabalho de Conclusão de Curso, a mesma foi isolada de madeira em decomposição coletada em uma Reserva Ambiental localizada na região do Taquaruçu, em Palmas (TO), em setembro de 2011. Cada amostra de madeira resultou em um isolamento distinto, sendo essa cepa posteriormente depositada na Coleção de Micro-organismos, DNA e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte – MG. Até o momento, essa levedura foi empregada experimentalmente apenas por Almeida *et al.* (2023)⁷² e, posteriormente, no presente Trabalho de Conclusão de Curso, configurando-se, portanto, como um microrganismo promissor e ainda pouco explorado para aplicações biotecnológicas.

2.3.1 Influência da relação C/N em fermentação da *Rhodosporidium toruloides* em hidrolisados hemicelulósicos

A razão carbono/nitrogênio (C/N) é um determinante central na fisiologia das leveduras oleaginosas e, especificamente, no comportamento de *Rhodosporidium toruloides* quanto à acumulação de lipídios e à produtividade global do processo fermentativo⁵⁴⁻⁵⁶. Em termos gerais, condições que associam excesso de carbono com limitação de nitrogênio sinalizam à célula o fim da fase de crescimento ativo e induzem o redirecionamento do fluxo de carbono para a biossíntese de ácidos graxos e triacilgliceróis (TAGs), que se acumulam em gotículas intracelulares⁷³.

Para definir a proporção das fontes de carbono e nitrogênio normalmente utiliza-se açúcares redutores como glicose, xilose e arabinose (obtidos a partir de hidrolisados hemicelulósicos) como principais fontes de carbono⁶⁸. Em estudos com hidrolisados complexos, o carbono pode ser suplementado com glicerol, ácidos orgânicos como acetato, ou misturas de hexoses e pentoses, a fim de evitar inibições por compostos inibidores presentes no meio e otimizar o rendimento lipídico⁶⁸. As fontes de nitrogênio mais empregadas são sais inorgânicos como sulfato de amônio, nitrato de sódio, e ureia, ou ainda fontes orgânicas como

extrato de levedura e peptona, que fornecem aminoácidos e vitaminas essenciais ao crescimento⁶⁸. A combinação e concentração desses nutrientes definem o balanço entre crescimento celular e acúmulo de lipídios, refletindo diretamente na eficiência do processo fermentativo.

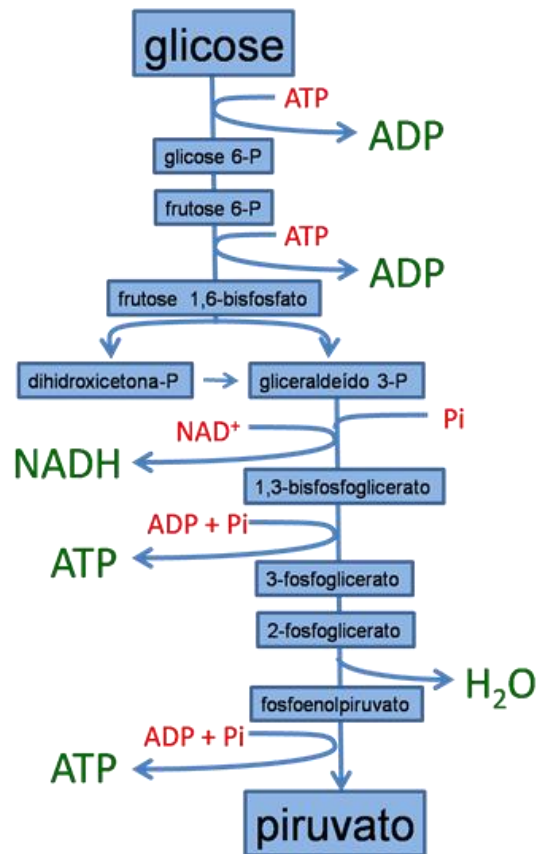
Embora uma maior relação C/N favoreça o acúmulo lipídico, essa condição também está associada à redução da produtividade global. Em ambientes com excesso de carbono e limitação de nitrogênio, as células de *R. toruloides* cessam a multiplicação celular devido à falta de nitrogênio para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, mas continuam a metabolizar o carbono disponível, direcionando-o para a via da lipogênese e formação de triacilgliceróis (TAGs)^{55,56,68}. Dessa forma, o teor lipídico percentual (g lipídio/g biomassa) aumenta, porém, a biomassa total formada no meio é menor, o que reduz a produtividade volumétrica (g lipídio/L·h). Esse comportamento caracteriza um trade-off típico em processos com leveduras oleaginosas: quanto maior o acúmulo intracelular de lipídios, menor tende a ser a velocidade de crescimento e, conseqüentemente, a taxa de produção total. Dessa forma, estudos visando condições ótimas de suplementação mostram-se importantes para a obtenção de um bom acúmulo de lipídios e uma produtividade satisfatória.

2.3.2 Rotas metabólicas de lipogênese da *Rhodospiridium toruloides*

Nessa seção iremos abordar as principais rotas metabólicas para a síntese de lipídios da *Rhodospiridium toruloides* e como a escassez de nitrogênio influencia no metabolismo da levedura.

Os açúcares consumidos pela levedura, sejam pentoses ou hexoses, necessitam ser metabolizados até a formação de gliceraldeído-3-fosfato (GA-3-P), intermediário central do metabolismo celular. Nesse ponto, ocorre uma diferenciação nas rotas de assimilação: a glicose, uma hexose, é degradada pela via glicolítica, resultando na geração de GA-3-P e, posteriormente, de piruvato. Já as pentoses, como a xilose, são metabolizadas pela via das pentoses fosfato, na qual são convertidas em GA-3-P. A partir desse intermediário, o metabolismo segue de forma semelhante ao da glicose, culminando também na formação de piruvato. A Figura 13 ilustra a via glicolítica. A Figura 14 ilustra a formação de GA-3-P através da via de pentoses fosfato⁷⁴.

Figura 13. Glicólise, promovendo a formação do intermediário GA-3-P e piruvatos.



Fonte. Fernandes (2014)⁷⁵.

Figura 14. Formação do intermediário GA-3-P através da via pentose fosfato.



Fonte. Adaptado de Ottone (2022)⁷⁶.

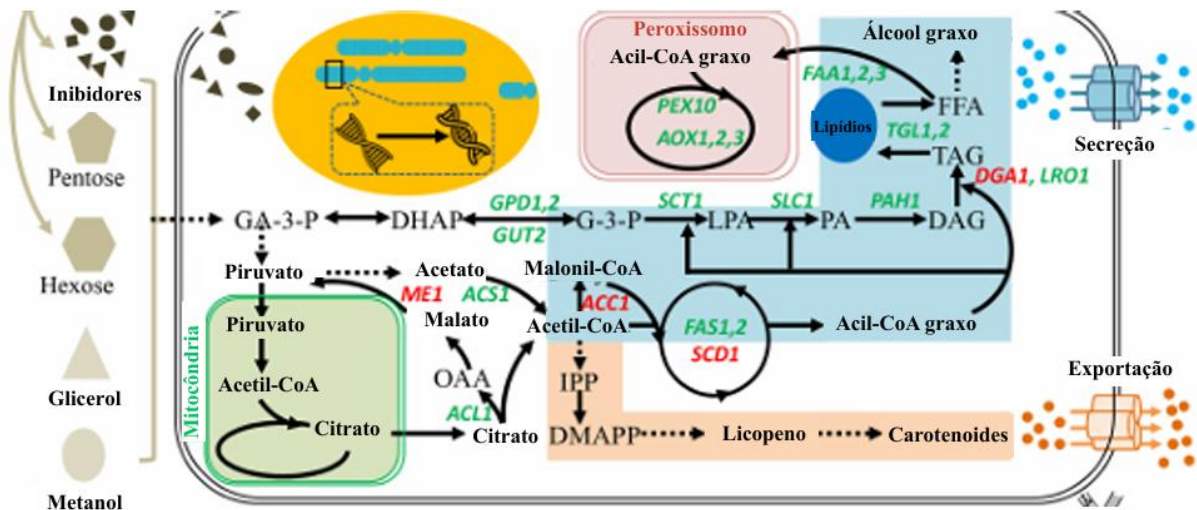
2.3.2.1 Rota 1 (Formação de Acil-coA)

Nessa rota, o piruvato formado é transportado para a mitocôndria, onde é convertido em acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase (PDH). O acetil-CoA reage com o oxaloacetato, originando citrato por meio do citrato sintase. Em condições normais, esse citrato continuaria sendo oxidado no ciclo do ácido cítrico (TCA), garantindo a produção de energia e precursores para o crescimento celular. No entanto, sob escassez de nitrogênio, a baixa disponibilidade desse nutriente reduz a síntese de proteínas e limita a multiplicação celular, inibindo a enzima isocitrato desidrogenase (IDH), responsável pela conversão de isocitrato em α -cetoglutarato no ciclo TCA. Com essa enzima menos ativa, o fluxo do ciclo TCA diminui, provocando o acúmulo de citrato na mitocôndria⁷⁴.

O citrato acumulado é então exportado para o citosol, onde é sintetizado em acetil-CoA citosólico através da ATP-citrato liase (ACL). Esse acetil-CoA é convertido em malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase (ACC) e, posteriormente, transformado em ácidos graxos pela acil-CoA⁷⁴ com a ação das enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferase, 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase, diacilglicerol aciltransferase 1.

Além disso, o piruvato pode ser convertido em acil-CoA diretamente no citosol, sem a necessidade de passagem pela mitocôndria. Nesse caso, o piruvato é inicialmente metabolizado em acetato por meio das enzimas piruvato descarboxilase (PDC) e acetaldeído desidrogenase (ALD). Em seguida, o acetato é sintetizado em a acetil-CoA pela ação da acetil-CoA sintetase (ACS), a qual segue o mesmo caminho para a formação de malonil-CoA e acil-CoA. Essas vias metabólicas estão ilustradas na Figura 15⁷⁴.

Figura 15. Rotas metabólicas resumidas de formação de triglicerídeos da *R. toruloides*. Legenda: GA-3-P – Gliceraldeído-3-fosfato; DHAP – Dihidroxiacetona fosfato; G-3-P – Glicerol-3-fosfato; LPA – Lisofosfatídico; PA – Ácido fosfatídico; DAG – Diacilglicerol; TAG – Triacilglicerol; FFA – Ácido graxo livre; IPP – Isopentenil difosfato; OAA – Oxaloacetato; DMAPP – Dimetilalil difosfato; ACL1 – ATP-citrato liase; ACS1 – Acetil-CoA sintetase; GUT2 – Glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial; GPD1.2 – Glicerol-3-fosfato desidrogenase; SCT1 – Glicerol-3-fosfato aciltransferase; SLC1 – 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase; PAH1 – Fosfatidato fosfatase; DGA1 – Diacilglicerol aciltransferase; LRO1 – Fosfolípido:diacilglicerol aciltransferase; TGL1.2 – Triacilglicerol lipase; FAA1.2.3 – Acil-CoA sintetase; PEX10 – Proteína de membrana do peroxissomo; AOX1.2.3 – Acil-CoA oxidase; FAS1.2 – Ácido graxo sintase; SCD1 – Estearoil-CoA desaturase.



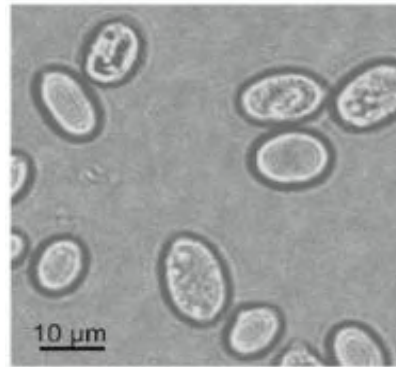
Fonte. Adaptado de Wen *et al.* (2020)⁷⁴.

2.3.2.2 Rota 2 (Formação de TAG)

Nessa rota, o gliceraldeído-3-fosfato (GA-3-P), proveniente da glicólise, é convertido em dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) pela enzima triose-fosfato isomerase. Em seguida, o DHAP é reduzido a glicerol-3-fosfato (G-3P) pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD). O G-3P atua como esqueleto de três carbonos sobre o qual os ácidos graxos, previamente ativados na forma de acil-CoA, a qual teve sua síntese abordada no item anterior, serão esterificados para formar lipídios neutros⁷⁴.

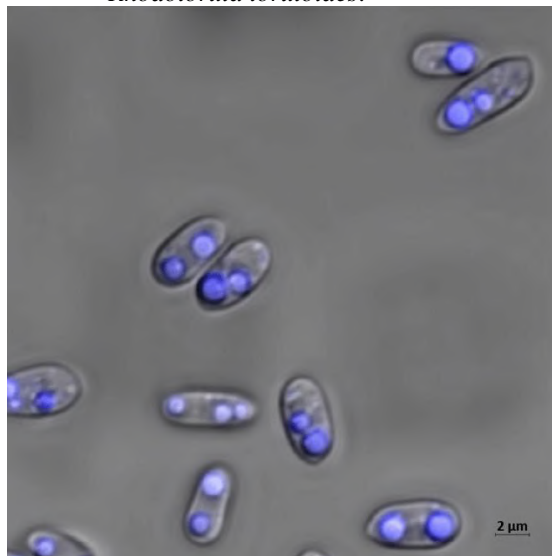
Inicialmente, o G-3P recebe um grupo acila por meio da enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT), originando o liso-fosfatidato (LPA). Em seguida, uma segunda molécula de acil-CoA é adicionada pela 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferase (LPAAT), formando o ácido fosfatídico (PA). O PA é então desfosforilado pela enzima fosfatidato fosfatase (PAP), dando origem ao diacilglicerol (DAG). Por fim, a enzima diacilglicerol aciltransferase (DGAT) catalisa a adição de um terceiro grupo acila ao DAG, resultando na formação do triacilglicerol (TAG)⁷⁴. A Figura 16 ilustra, novamente, a lipogênese da *R. toruloides*.

Figura 17. Imagem em microscópio do acúmulo lipídico da levedura oleaginosa *Rhodotorula glutinis*.



Fonte. Maza *et al.* (2020)⁷⁷.

Figura 18. Imagem de microscopia confocal de gotículas lipídicas coradas com Nile Red da levedura oleaginosa *Rhodotorula toruloides*.



Fonte. Hernandez *et al.* (2021)⁷⁸.

Entre os métodos de ruptura celular aplicados à extração de lipídios de leveduras oleaginosas, os métodos físicos ou mecânicos estão entre os mais utilizados e envolvem a aplicação de forças externas para romper as células. Dentre eles, destaca-se a moagem, responsável por romper a parede celular por meio de forças de impacto e cisalhamento. A sonicação (ou ultrassom), por sua vez, baseia-se na formação e implosão de microbolhas geradas pelas ondas ultrassônicas, produzindo ondas de choque locais que danificam a parede celular e promovem a liberação dos lipídios intracelulares⁷⁹.

O método da liquefação hidrotermal é capaz de promover simultaneamente a ruptura celular e a extração lipídica. (LI *et al.*, 2021)⁸⁰ detalhou que na extração de lipídios da *Rhodospiridium toruloides*, o tratamento a 160 °C por 60 minutos utilizando etanol como

solvente resultou na completa desestruturação da parede celular e em rendimentos satisfatórios de produtividade de lipídios. A Figura 19 ilustra o método por liquefação hidrotermal.

Figura 19. Representação do método de liquefação hidrotermal, com lise celular e extração de lipídios de leveduras oleaginosas.



Fonte. Adaptado de Li *et al.* (2021)⁸⁰.

Os métodos químicos e biológicos de ruptura celular também têm se mostrado eficazes na liberação de lipídios intracelulares de leveduras oleaginosas. Entre esses, o tratamento enzimático destaca-se por sua seletividade, uma vez que promove a degradação de componentes estruturais da parede celular, facilitando a liberação dos lipídios. O estudo de JIN *et al.* (2012)⁸¹, mostrou que a aplicação de enzimas e éter de etila resultou em uma recuperação de aproximadamente 96,6% dos lipídios em *Rhodospiridium toruloides*. Outro método amplamente utilizado é a digestão ácida, que utiliza ácidos fortes para hidrolisar a parede celular e aumentar a permeabilidade da membrana⁸¹.

Após a ruptura das células, a extração dos lipídios microbianos é geralmente realizada com uso de uma mistura de clorofórmio, metanol e água. O princípio fundamental desse método consiste na formação de um sistema de suas fases, na qual os lipídios solubilizam-se na fase clorofórmica devido sua apolaridade^{19,20,82}. Apesar a eficiência de extração desse método, o uso de clorofórmio e metanol levanta preocupações quanto à toxicidade, inflamabilidade e impacto ambiental, motivando pesquisas em busca de substituições mais sustentáveis, como o uso de solventes verdes (etil acetato e etil lactato), que seguem os mesmos princípios de polaridade diferencial, mas com menor risco à saúde e ao meio ambiente⁸². A Figura 20 ilustra a separação e extração de lipídios por diferença de polaridade.

Figura 20. Representação do método de extração de lipídios com clorofórmio e metanol.

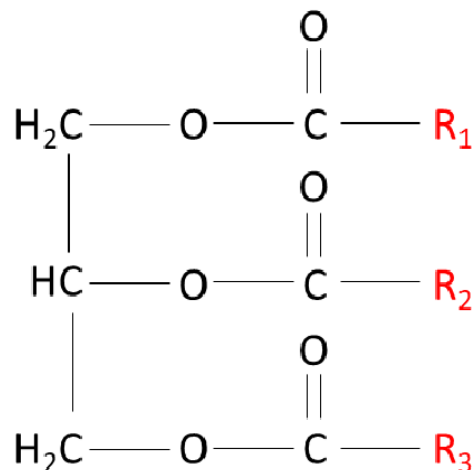


Fonte. Saini *et al* (2021)⁸³.

2.5 Composição e caracterização de lipídios microbianos da *Rhodospiridium toruloides*

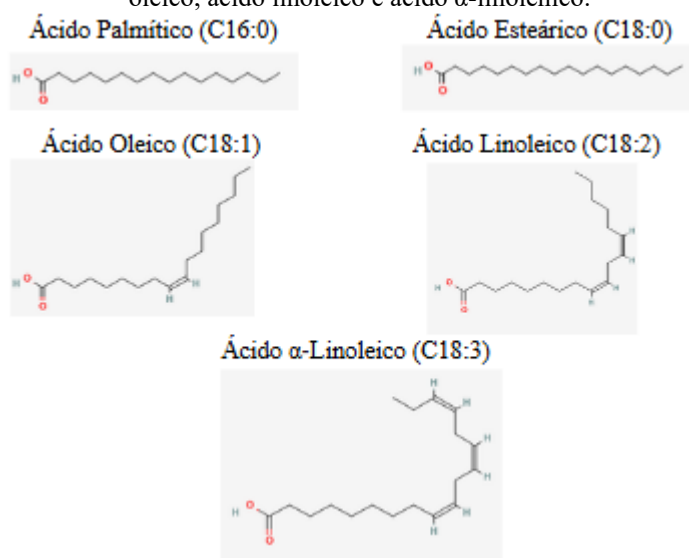
A produção lipídica pela *Rhodospiridium toruloides* caracteriza-se principalmente pela síntese e acumulação intracelular de lipídios de reserva, especialmente triacilgliceróis (TAGs)⁸⁴. A Figura 21 ilustra a estrutura molecular de um triacilglicerol. Em termos de composição, os lipídios sintetizados pela *Rhodospiridium toruloides* são majoritariamente constituídos por cadeias de ácidos graxos longos, com 16 e 18 carbonos. Os ácidos graxos mais comuns incluem ácido palmítico (C16:0) com cerca de 15 a 40 % do total de ácidos graxos, ácido esteárico (C18:0) com aproximadamente 10 a 20 %, ácido oleico (C18:1) entre 40 e 60 %, ácido linoleico (C18:2) entre 1-10 % e ácido α -linolênico (C18:3) em cerca de 1-2 %⁸⁴. A Figura 22 ilustra a estrutura molecular desses ácidos graxos.

Figura 21. Representação da estrutura molecular de um triacilglicerol.



Fonte. Yang (2020)⁸⁵.

Figura 22. Representação da estrutura molecular dos ácidos graxos: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido α -linolênico.



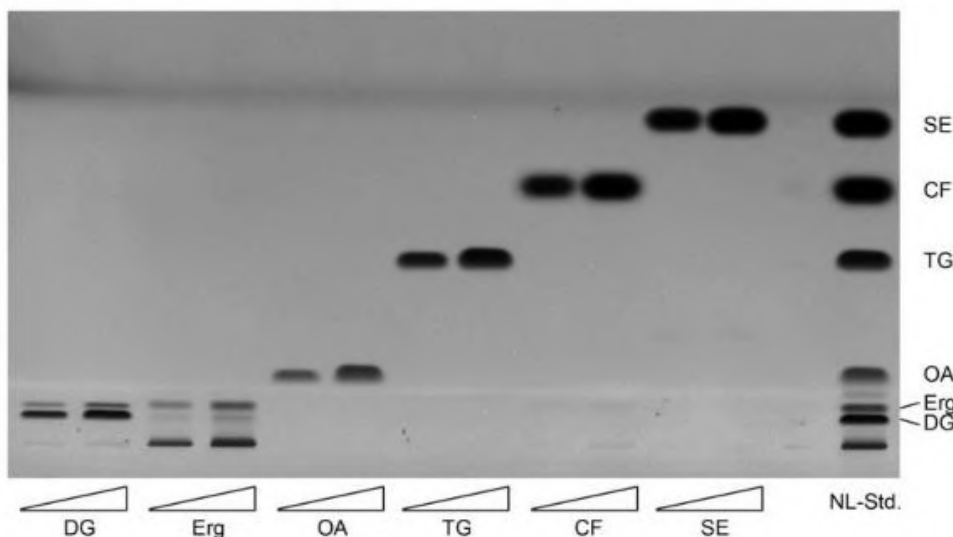
Fonte. Adaptado de Pubchem (2025)⁸⁶.

A caracterização de lipídios microbianos pode ser realizada por diferentes métodos cromatográficos, entre os principais estão a cromatografia em camada fina (TLC), a cromatografia em camada fina de alta performance (HPTLC) e a cromatografia gasosa (GC)⁸⁷. Os dois primeiros têm como função distinguir a classe do lipídio (se é um TAG, DAG, MAG, fosfolipídio ou ácido graxo livre), enquanto o GS-MC indica e quantifica o perfil dos ácidos graxos presentes na amostra⁸⁸.

A TLC é baseada na migração dos compostos sobre uma fase estacionária polar, normalmente constituída por sílica gel, e uma fase móvel apolar, composta por uma mistura de solventes orgânicos. Durante o processo, uma pequena quantidade de amostra lipídica é aplicada sobre a placa, e o solvente, ao subir por capilaridade, transporta os componentes da amostra em velocidades distintas, de acordo com sua afinidade relativa com as fases⁸⁸. Dessa forma, é possível identificar a classe dos óleos microbianos através da faixa característica ao longo da placa, que pode ser visualizada por reagentes de coloração, como vapores de iodo ou ácido sulfúrico⁸⁹. Embora a TLC seja uma técnica de fácil execução e baixo custo, ela tem limitações quanto à precisão e à reprodutibilidade. Nesse contexto, a HPTLC representa um avanço significativo em relação à metodologia convencional. Essa técnica utiliza placas com partículas de sílica menores e mais uniformes, o que promove maior resolução e sensibilidade na separação dos compostos. Além disso, a HPTLC permite a automação das etapas de

aplicação e detecção, reduzindo interferências experimentais⁹⁰. A Figura 23 ilustra um exemplo de padrão de caracterização de lipídios na determinação de sua classe através de HTLC.

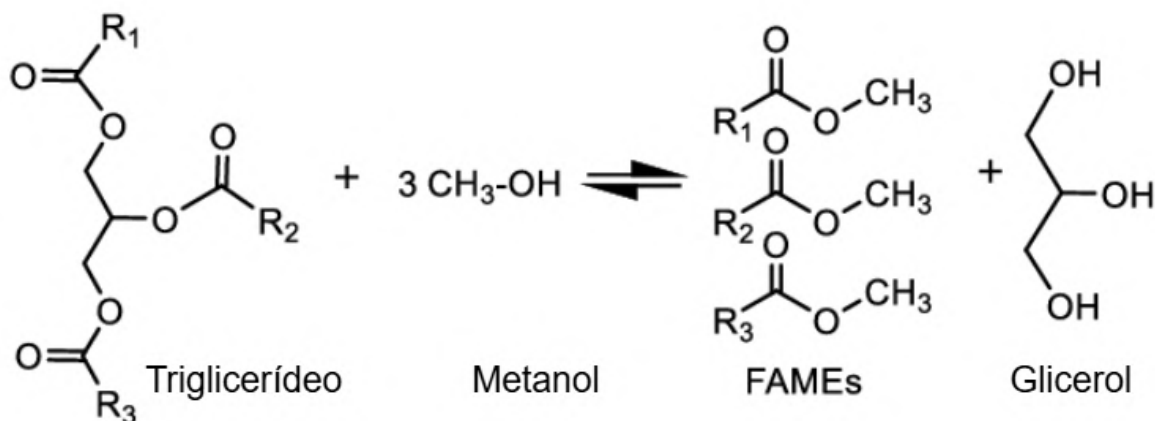
Figura 23. Padrão de caracterização lipídica em HTLC. DG – Diglicerídeo, Erg – Ergosterol, OA – Ácido oleico, TG – Triacilglicerol, CF – Formiato de colesterol, CE – Éster de colesterol.



Fonte. Meyer *et al.* (2021)⁹⁰.

Para a utilização do método de cromatografia gasosa (CG) na caracterização de lipídios microbianos é necessário convertê-los em compostos derivados mais adequados à fase gasosa, uma vez que a maioria dos ácidos graxos e lipídios naturais não é suficientemente volátil nem termicamente estável para ser analisada diretamente por essa técnica⁹¹. Por isso, os lipídios extraídos são submetidos a uma etapa de transesterificação, na qual os ácidos graxos ligados ao glicerol são transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME). Essa reação pode ser conduzida em meio ácido, básico ou neutro e utilizando metanol como agente metilante. A formação dos FAMES auxilia na redução do ponto de ebulição das moléculas e elimina a possibilidade de degradação térmica durante a CG, garantindo uma separação eficiente na coluna cromatográfica⁹¹. Assim, cada FAME é eluído de acordo com sua volatilidade e interação com a fase estacionária, produzindo um cromatograma com picos característicos que representam os diferentes ácidos graxos presentes na amostra⁹¹. A Figura 24 ilustra a reação química de formação de FAME por transesterificação.

Figura 24. Reação química de transesterificação para a síntese de FAMEs utilizando metanol.



Fonte. Adaptado de Farobie (2016)⁹².

2.6 Aplicações industriais de lipídios microbianos

Como mencionado anteriormente, os lipídios microbianos apresentam ampla gama de aplicações industriais devido à sua composição química semelhante à dos óleos vegetais e animais¹⁵. Essa característica permite seu emprego como matérias-primas alternativas em diversos setores, com destaque para os segmentos de biocombustíveis, alimentos, cosméticos e bioplásticos.

Na indústria de biocombustíveis, os óleos microbianos representam uma alternativa sustentável para a produção de biodiesel, uma vez que são compostos majoritariamente por triacilgliceróis, que podem ser convertidos em ésteres metílicos por meio da transesterificação¹⁵.

No setor alimentício, os lipídios microbianos têm sido introduzidos comercialmente em diversos produtos. A DIC Corporation comercializa o ácido docosahexaenoico, ácido graxo e óleo derivado da microalga *Schizochytrium sp*, como insumo para alimentos e suplementos alimentares e uma alternativa sustentável ao óleo de peixe⁹³. A Figura 25 ilustra o produto citado.

Figura 25. Ácido docosahexaenoico, óleo microbiano comercializado pela DIC Corporation.



Fonte DIC Corporation (2023)⁹³.

No setor cosmético, lipídios microbianos têm sido incorporados em formulações como emolientes, óleos condicionantes e biossurfactantes, oferecendo alternativas sustentáveis às matérias-primas de origem animal e vegetal. O produto comercial Neossance™ Squalane, desenvolvido pela Amyris a partir de biolipídios, é amplamente utilizado como emoliente em cremes, óleos faciais e produtos capilares por marcas do segmento cosmético⁹⁴. Outro grupo de lipídios microbianos com aplicações cosméticas relevantes são os sophorolipids, biossurfactantes produzidos pela levedura *Starmerella bombicola*⁹⁵.

Por fim, os óleos microbianos também têm aplicabilidade no ramo dos biopolímeros, atuando como fontes renováveis de monômeros para a produção de materiais biodegradáveis. Devido à sua composição rica em ácidos graxos, esses lipídios podem ser convertidos em poliésteres e poliuretanos por meio de reações de polimerização ou modificação química⁹⁶.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação C/N em cultivos da levedura *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 utilizando hidrolisado hemicelulósico da mistura bagaço e palha de cana-de-açúcar visando o acúmulo de lipídeos microbianos.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar;
- Caracterizar o hidrolisado hemicelulósico de mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar;
- Avaliar a capacidade fermentativa da levedura *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 em hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar usando diferentes relações de C/N no meio;
- Estudar a metodologia de adaptação gradual da levedura *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 em hidrolisado hemicelulósico três vezes concentrado;
- Quantificar os lipídeos obtidos intracelularmente nas fermentações do hidrolisado hemicelulósico usando a levedura *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento do presente projeto de pesquisa foi dividido nas seguintes etapas metodológicas: caracterização da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar, pré-tratamento da biomassa da cana-de-açúcar através de hidrólise ácida, caracterização do hidrolisado hemicelulósico, fermentação da cepa em hidrolisado hemicelulósico não-destoxificado, avaliação da relação C/N através de um planejamento experimental, seguida pela adaptação da levedura em hidrolisado três vezes concentrado e por fim, extração e quantificação dos lipídios intracelulares acumulados.

4.1 Caracterização da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar

A mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (proporção 1:1) foi caracterizada quanto às frações de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos de acordo com metodologia padrão de caracterização de carboidratos e lignina estruturais de biomassa do *National Renewable Energy Laboratory – NREL*⁹⁷.

4.2 Pré-tratamento com hidrólise ácida e caracterização do hidrolisado hemicelulósico

O hidrolisado hemicelulósico de mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (proporção 1:1) utilizado neste projeto foi previamente obtido pelo grupo de pesquisa APIBIL (Aproveitamento Integral de Biomassas Lignocelulósicas) por Almeida et al. (2022)⁹⁸, por meio de hidrólise ácida empregando ácido sulfúrico diluído, nas condições de relação sólido:líquido 1:10, temperatura de 120°C, concentração de 0,5% (m/v) de H₂SO₄ e tempo de reação de 15 min.

Para a caracterização do hidrolisado obtido, foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para obter os teores de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, 5-hidroximetilfurfural e furfural. As amostras inicialmente foram filtradas em filtro Sep Pack C18 e injetadas em um sistema de cromatografia líquida Shimadzu acoplado a um detector de índice de refração RID. Durante a cromatografia, os açúcares glicose, xilose e arabinose e o ácido acético foram separados através da utilização de fase móvel H₂SO₄ 0,01 N, em uma coluna analítica BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 60°C à vazão de 0,6 mL/min.

Para determinação das concentrações dos inibidores furfural e 5-hidroximetilfurfural bem como outros derivados fenólicos, as amostras foram previamente filtradas em membrana

Minisart e injetadas utilizando-se as seguintes condições: coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, (4,6mm x 100mm, 3,5 µm) mantida à temperatura de 30 °C; volume de injeção de 10 µL; detector de ultra-violeta UV-VIS (276 nm); fase móvel acetonitrila/água 1:8 e vazão de 0,8 mL/min.

4.3 Micro-organismo

A cepa oleaginosa *Rhodosporidium toruloides* UFMG-CM-Y2781, utilizada neste estudo, foi obtida da Coleção de Micro-organismos, DNA e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa. A levedura foi originalmente isolada de amostras de madeira em decomposição na região de Taquaruçu, no estado do Tocantins, e o sequenciamento e análise do genoma foram realizados no Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG⁹⁹.

A cepa foi armazenada a -80 °C em 30% (v/v) de glicerol. Para a manutenção da levedura em estoque, foi preservada em placas de Petri contendo meio de cultura solidificado (10 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte e 20 g/L de ágar) após incubação em estufa a 28 °C por 24 horas. As placas foram armazenadas a 4 °C, com repiques realizados a cada 25 dias.

4.4 Preparo do inóculo da levedura

Para a preparação do inóculo utilizou-se o meio YPG (Extrato de Levedura – Peptona - Glicose) nas seguintes proporções: 30 g/L glicose, 20 g/L peptona, 10 g/L extrato de levedura. Dessa forma, foram utilizado 400 mL de meio YPG em um erlenmeyer de 1000 mL e adicionada uma alça de placa da cultura estoque da cepa *Rhodosporidium toruloides* UFMG-CMY2781 que foram previamente crescidas em placas de Petri ou tubos inclinados contendo os seguintes nutrientes: 10 g/L glicose, 5 g/L peptona, 3 g/L extrato de levedura, 3 g/L extrato de malte e ágar 20 g/L conseguinte foi incubado por 24 horas, a 28°C, 200 rpm em um em um agitador orbital (New Brunswick Scientific, U.S.). Após este período, centrifugou-se o volume do meio em tubos Falcon (2500 xg por 5 minutos). Por fim, as células foram lavadas duas vezes com água destilada esterilizada para prosseguir com o preparo do inóculo e a fermentação.

Para realizar o inóculo da levedura nos ensaios fermentativos, retirou-se um pequeno volume com as células concentradas e centrifugadas (solução mãe) e determinou-se a

concentração celular (g/L) por turbidimetria medindo a OD 600 nm do caldo de fermentação e convertido em concentração de biomassa usando uma curva de calibração (Anexo 1).

4.5 Cultivo das leveduras em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar: avaliação da relação C/N

O hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificar teve o pH ajustado para 5,5 com solução de NaOH (1M), filtrado e esterilizado. Visando determinar as melhores condições para os cultivos em frascos agitados para maximização de produção de lipídeos pela levedura *R. toruloides* UFMG-CMY2781 usando hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana, foi realizado um estudo da relação C/N empregando um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, para avaliar o efeito das fontes de nitrogênio (extrato de levedura, ureia, sulfato de amônio e peptona) sobre o crescimento celular. Assim, o hidrolisado hemicelulósico foi suplementado com os seguintes nutrientes: 0,5 – 3,7 g/L extrato de levedura; 0,4 – 3,0 g/L peptona; 0,1 -0,8 g/L ureia, 0,1 – 0,8 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 3,0 g/L KH_2PO_4 , atingindo razão C/N de 8 a 64 (Tabela 3).

Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} visando avaliar a influência das fontes de nitrogênio no crescimento celular da levedura *R. toruloides* UFMG-CMY2781 em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificar.

Experimento	Codificados				C/N
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
1	-1	-1	-1	-1	64
2	1	-1	-1	1	14
3	-1	1	-1	1	14
4	1	1	-1	-1	14
5	-1	-1	1	1	14
6	1	-1	1	-1	14
7	-1	1	1	-1	14
8	1	1	1	1	8
9*	0	0	0	0	14
10*	0	0	0	0	14
11*	0	0	0	0	14
Variáveis (g/L)			-1	0	1
Ureia (X ₁)			0,1	0,5	0,8
Extrato de Levedura (X ₂)			0,5	2,1	3,7
Peptona (X ₃)			0,4	1,7	3,0
Sulfato de amônio (X ₄)			0,2	1,0	1,8

*Pontos Centrais (PC)

Fonte. Próprio Autor.

A concentração de inóculo utilizada foi de 1,0 g/L e os ensaios foram conduzidos sem replicação. Utilizou-se erlenmeyers de 250 mL, com aproximadamente 50 mL de meio fermentativo para cada experimento, os quais foram mantidos sob agitação em um “shaker” (agitador orbital) durante quatro dias de fermentação. Alíquotas foram colhidas a cada 24 horas para análise do crescimento celular, pH e consumo de substrato durante a fermentação. Ao final, as células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com água destilada, secas a 60°C e armazenadas para posterior determinação de lipídios totais.

4.6 Adaptação da levedura *R. toruloides* UFMG-CMY2781 ao hidrolisado 3 vezes concentrado e fermentação teste em hidrolisado 2 vezes concentrado

A adaptação da levedura foi realizada com o cultivo da *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 em um meio sintético (30 g/L xilose, 4 g/L glicose, 2 g/L extrato de levedura, 1 g/L sulfato de magnésio heptahidratado, 2g/L sulfato de amônio e 3 g/L fosfato monopotássico), no qual

adicionou-se hidrolisado hemicelulósico três vezes concentrado (11,86 g/L glicose, 82,44 g/L xilose, 10,67 g/L arabinose, 6,56 g/L ácido acético e 2,19 g/L celobiose). Inicialmente, a levedura foi inoculada em um meio contendo 10% (v/v) de hidrolisado hemicelulósico e 90% (v/v) de meio sintético. Após 24 horas de cultivo, as células foram coletadas e inoculadas novamente em um novo meio com aumento gradual da proporção de hidrolisado hemicelulósico, elevando-se a concentração para 20% de HHBCA e 80% de meio sintético. Esse procedimento foi repetido a cada 24 horas, durante dez dias, com incrementos sucessivos na fração de hidrolisado hemicelulósico, até que a levedura fosse finalmente cultivada em meio contendo 100% de hidrolisado hemicelulósico três vezes concentrado.

Após a metodologia de adaptação, foi realizado um novo ensaio fermentativo com a cepa adaptada. Dessa forma, a levedura foi inoculada em hidrolisado hemicelulósico duas vezes concentrado (7,40 g/L glicose, 50,55 g/L xilose, 6,10 g/L arabinose, 5,52 g/L ácido acético e 1,37 g/L celobiose). Assim como no planejamento fermentativo inicial, utilizou-se erlenmeyers de 250 mL, com aproximadamente 50 mL de meio fermentativo para cada experimento, os quais foram mantidos sob agitação em um “shaker” (agitador orbital) durante quatro dias de fermentação. Alíquotas foram colhidas em triplicata a cada 24 horas para análise do crescimento celular, pH e consumo de substrato durante a fermentação.

4.7 Quantificação dos lipídeos intracelulares

A extração e determinação de lipídios foi realizada de forma adaptada baseada no método descrito por Folch *et al.* (1957)¹⁰⁰. Para a recuperação dos lipídios é necessária uma etapa de ruptura celular, em resumo, uma mistura de 10 mL de clorofórmio:metanol (2:1 v/v) foi adicionada a aproximadamente 200 mg de biomassa seca previamente macerada em um tubo com rosca e incubados em um banho termostático a 20 °C por 24 horas. Posteriormente, a mistura foi colocada em um ultrassom por 10 minutos. Consequente, foi adicionado 2 mL de uma solução saturada de NaCl (0,5 g/L) em cada tubo. Após esta etapa, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2500 *xg*, que resultou na formação de duas fases: aquosa e orgânica, que foi cuidadosamente separada e filtrada usando papel Whatman #8 para remoção dos resíduos celulares, foi utilizado um tubo pré-pesado, e após processo de filtração, levados a uma capela de exaustão por pelo menos 24 horas para evaporação do solvente. Por fim, os frascos foram pesados em balança analítica. O conteúdo lipídico (mg/g), concentração lipídica (mg/L) e produtividade lipídica (mg/L.h) foram determinados gravimetricamente conforme equações 1 ao 3.

$$\text{Conteúdo lipídico} = \frac{\text{massa lipídios (mg)}}{\text{biomassa seca (g)}} \quad (1)$$

$$\text{Concentração} = \frac{\text{massa lipídios (mg)}}{\text{volume amostra (L)}} \quad (2)$$

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{concentração lipídica (mg.L}^{-1}\text{)}}{\text{Tempo de fermentação (horas)}} \quad (3)$$

4.8 Análises da Estatística

Os dados obtidos nos ensaios fermentativos foram analisados e tratados estatisticamente com o auxílio do software Microsoft Excel. Todas as amostras foram coletadas em duplicata, com exceção da fermentação teste com a levedura adaptada que foi realizada em triplicata, e os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores experimentais obtidos. O planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} foi realizado pelo *software* Statistica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar e caracterização da celulignina obtida após o pré-tratamento.

Ao caracterizar a amostra da mistura de bagaço e cana-de-açúcar e a celulignina obtida após pré-tratamento com ácido diluído, obteve-se os seguintes resultados de composição mássica (Tabela 4).

Tabela 4. Composição da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1) *in natura* e após pré-tratamento com ácido diluído

Componente (%)	Biomassa de Cana	Celulignina
Celulose	34,63	50,37
Hemicelulose	23,22	5,78
Lignina	30,75	33,55
Grupos Acetil	5,31	n.d.
Cinzas	1,40	0,54
Extrativos	3,01	n.d.

n.d. (não detectado)

Fonte. Próprio Autor.

Ao comparar os resultados obtidos com o encontrado na literatura, observa-se frações mássicas semelhantes. Em destaque, observa-se a semelhança com o trabalho de (Rabelo, 2007)¹⁰¹, apresentado na Tabela 5. Durante a análise composicional da biomassa da cana-de-açúcar, observou-se que a celulose (34,63%) como homopolímero predominante; a hemicelulose (23,22%), estrutura heteropolimérica composta por xilana acetilada e arabinada, foi considerada o terceiro maior componente da biomassa. O teor de lignina obtido consiste nas frações solúveis e insolúveis, totalizando 30,75%.

Tabela 5. Caracterização da biomassa de cana-de-açúcar obtida por diferentes autores.

Componente (%)	Pitarelo (2007) ¹⁰¹	Gouveia et al. (2009) ¹⁰²	Canilha et al. (2011) ¹⁰³	Rabelo (2007) ¹⁰⁴
Celulose	41,1	42,8	45,0	38,4
Hemicelulose	22,7	25,8	25,8	23,2
Lignina total	31,4	22,4	19,1	25,0

Fonte. Elaborado pelo Autor com dados de Pitarelo (2007)¹⁰¹, Gouveia *et al.* (2009)¹⁰², Canilha *et al.* (2011)¹⁰³ e Rabelo (2007)¹⁰⁴.

A Tabela 4 ilustra os resultados da caracterização da composição da fração sólida recuperada (celulignina). Observa-se que, após a hidrólise ácida, as proporções de celulose e

lignina na biomassa de cana-de-açúcar aumentaram de forma relativa, em virtude da solubilização e remoção dos açúcares constituintes da hemicelulose. Esse comportamento indica que as condições de hidrólise empregadas foram adequadas para a extração dos açúcares presentes na fração hemicelulósica.

A celulose e a lignina corresponderam a aproximadamente 90% da massa total da fração sólida, confirmando sua predominância após o processo. Parte da hemicelulose, entretanto, não foi completamente hidrolisada, permanecendo em 5,78% da massa total da celulignina. Os resultados obtidos mostraram-se consistentes com os reportados por Philippini (2012)¹⁰⁵, que caracterizaram a celulignina de bagaço de cana-de-açúcar com 54,17% de celulose, 5,3% de hemicelulose, 37,28% de lignina e 0,54% de cinzas, demonstrando a similaridade entre as composições encontradas e os valores descritos na literatura.

A presença de apenas 5% de hemicelulose residual na fração de celulignina após o pré-tratamento ácido evidencia uma eficiente separação das frações e elevado grau de remoção da hemicelulose. A redução da fração hemicelulósica residual e a consequente liberação de açúcares simples no meio favorecem a disponibilidade de substratos assimiláveis, condição essencial para o crescimento microbiano e posterior acúmulo de lipídios pela levedura. Além disso, a baixa solubilização da lignina reduz a formação de compostos inibidores, como fenóis e derivados furânicos, contribuindo para a viabilidade do processo fermentativo e a melhoria do desempenho metabólico da *Rhodospiridium toruloides* no hidrolisado obtido.

5.2 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico

A Tabela 6 apresenta a composição do hidrolisado hemicelulósico obtido no pré-tratamento com ácido diluído da mistura palha e bagaço de cana-de-açúcar. Na solução líquida obtida, é possível confirmar a presença dos monossacarídeos glicose, xilose e arabinoses. De forma análoga, também foi identificado a presença de compostos capazes de inibir o crescimento celular. Em destaque, é observada a presença de ácido 2,4-dihidroxibenzoico e siringaldeído. Além disso, também foram detectadas concentrações de ácido fórmico e ácido acético.

Tabela 6. Composição química do hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar.

Componente	Concentração (g/L)	Porcentagem em massa
Glicose	3,79	9,9%
Xilose	26,29	68,4%
Arabinose	3,58	9,3%
Ácido fórmico	0,59	1,5%
Furfural	n.d.	n.d.
Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	0,02	0,1%
Vanilina	n.d.	n.d.
Siringaldeído	0,39	1,0%
Ácido acético	3,77	9,8%

n.d. (não detectado)

Fonte. Próprio Autor.

A análise dos dados indica que os açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico são predominantemente pentoses, correspondendo a 77% da massa total, sendo a xilose o principal monossacarídeo, seguida da arabinose. A glicose, uma hexose, representa apenas cerca de 10% da composição. Os 13% restantes são compostos por inibidores e produtos de degradação, como ácido acético, ácido fórmico, siringaldeído e traços de ácido 2,4-dihidroxibenzoico. A predominância de pentoses no hidrolisado confirma que a xilose é o principal monômero da fração hemicelulósica do bagaço e da palha da cana-de-açúcar, o que está de acordo com a composição estrutural da biomassa. Esses resultados estão em conformidade com os relatados por (Fonseca, 2009)¹⁰⁶, que caracterizaram o hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana, encontrando as seguintes proporções: glicose 2%, xilose 62%, arabinose 5%, siringaldeído 2%, fenóis totais 18% e ácido acético 10%. A caracterização dos compostos inibidores revela que o ácido acético é o principal inibidor presente no hidrolisado, o que se explica pela liberação dos grupos acetil da hemicelulose durante o pré-tratamento ácido¹⁰. A presença de ácido fórmico é decorrente da degradação do 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), originado a partir da glicose¹⁰. Por outro lado, a ausência de furfural, produto da degradação de xilose e arabinose, sugere que este tenha sido convertido em ácido fórmico durante o processo. O siringaldeído também foi identificado entre os inibidores e é um produto típico da degradação da lignina durante a hidrólise ácida¹⁵. De forma semelhante, a vanilina e o ácido 2,4-dihidroxibenzoico são derivados da mesma rota de degradação da lignina. De modo geral, a caracterização mostra que aproximadamente 1,1% dos inibidores detectados são provenientes da degradação da lignina, valor considerado baixo, visto que a lignina permaneceu

predominantemente na fração sólida (celulignina) e não foi solubilizada durante o pré-tratamento.

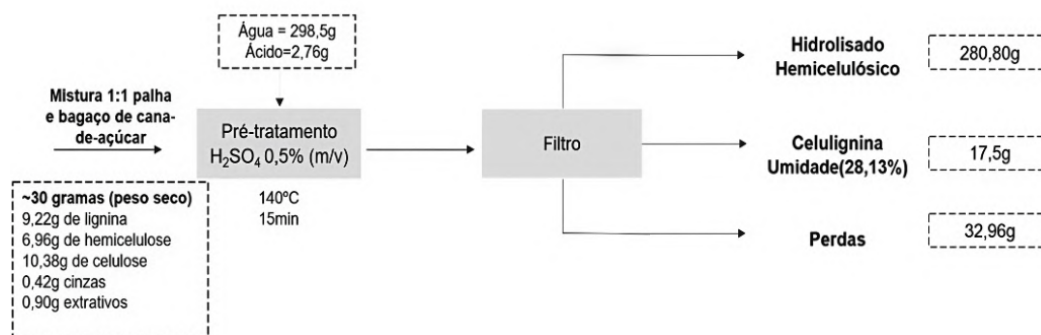
Ao analisar as concentrações obtidas dos compostos inibidores, nota-se que estão fora da faixa inibitória descrita na literatura, com exceção do ácido acético²⁰. O trabalho de Zhao *et al.* (2012)²⁰ apresentou resultados em que o ácido acético em concentrações próximas a 5 g/L já confere inibição à *Rhodosporidium toruloides*, quantidade próxima à obtida nesse trabalho, 3,77 g/L.

Esses resultados indicam que o pré-tratamento aplicado foi eficiente não apenas na solubilização da hemicelulose e liberação de açúcares fermentescíveis, mas também na minimização da formação de compostos inibitórios, tornando o hidrolisado hemicelulósico adequado para o cultivo da *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 e para posteriores ensaios fermentativos voltados à produção de lipídios microbianos.

5.3 Balanço de massa do processo de pré-tratamento com ácido diluído

Durante o processo de fracionamento da hemicelulose da mistura de bagaço e palha da cana-de-açúcar (1:1), pesou-se os valores de massa inicial e final de cada reagente, produto e subproduto, com o intuito de construir o balanço de massa que descreva o processo. Foram adicionados ao reator 30 gramas de biomassa, dos quais 17,5 gramas de celulignina foram recuperados após a hidrólise. Além disso, 150 mL de uma solução de H₂SO₄ (0,5% m/v; d=1,84 kg/L) foram adicionados, e apenas 138 mL foram recuperados ao fim do processo. Logo 12 mL foram retidos na fração sólida de celulignina. Com esses valores, e em posse das informações de densidade de hidrolisado e água, foi possível determinar a massa final de hidrolisado hemicelulósico e, conseqüentemente, a massa perdida durante o pré-tratamento. Por fim, diante de todas as massas iniciais e finais, o balanço de massa é apresentado na Figura 26.

Figura 26. Balanço de massa da etapa de pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar utilizando ácido diluído.



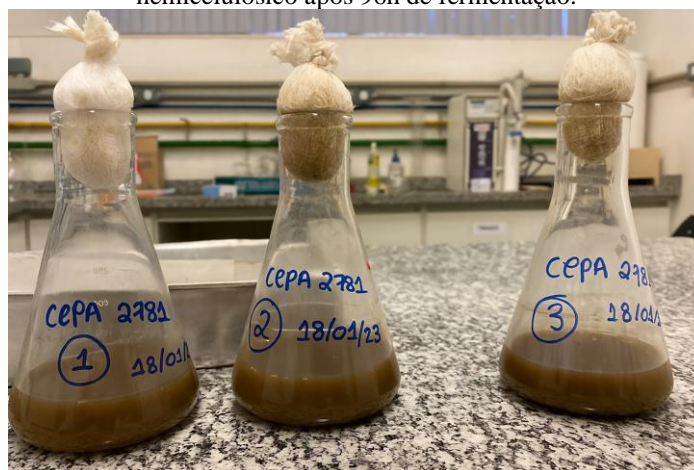
Fonte. Próprio Autor.

5.4 Planejamento experimental avaliando diferentes razões C/N na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificar.

A etapa de avaliação da razão C/N foi conduzida com o objetivo de determinar o efeito da disponibilidade de nitrogênio sobre o crescimento celular da *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não destoxificado. Essa variável é fundamental, uma vez que a limitação de nitrogênio é um dos principais gatilhos metabólicos para a rota lipogênica em leveduras oleaginosas, o que influencia o equilíbrio entre crescimento e acúmulo de lipídios.

Foram testadas diferentes fontes de nitrogênio, mantendo-se constante a quantidade de carbono, de modo a identificar as condições mais favoráveis ao crescimento celular e ao aproveitamento do substrato. Realizaram-se 11 ensaios fermentativos, nos quais foram avaliados o consumo de açúcares, o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e o pH final, conforme apresentado na Tabela 7. A Figura 27 ilustra os ensaios fermentativos utilizados. A Figura 28 apresenta a variação da concentração celular ao longo do tempo para os 11 experimentos realizados.

Figura 27. Ensaios fermentativos da *Rhodospiridium toruloides* UFMG-CM-Y2781 em hidrolisado hemicelulósico após 96h de fermentação.



Fonte. Próprio Autor.

Na Tabela 7, observa-se que a concentração de açúcares no hidrolisado manteve-se praticamente constante durante a fermentação, com consumo total variando de 0,64% a 7,90%. O pH final apresentou pequena variação, permanecendo próximo de 5,0 em todos os ensaios. O fator de conversão $Y_{X/S}$ variou de 0,31 a 4,83, indicando diferenças na eficiência de conversão do substrato em biomassa em função da disponibilidade de nitrogênio.

Tabela 7. Consumo de açúcares, concentração celular e pH final obtidos nas fermentações de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar após 96h seguindo o planejamento fatorial fracionário 2^{4+1} (ver Tabela 3). Em parênteses o valor real em g/L.

Experimento	Codificados				C/N	Consumo		pH Final
	Ureia X ₁	E.L X ₂	Peptona X ₃	MgSO ₄ X ₄		açúcares (%)	Y _{X/S}	
1	-1 (0,1)	-1 (0,5)	-1(0,4)	-1(0,2)	64	7,90	0,31	4,98
2	1 (0,8)	-1 (0,5)	-1(0,4)	1 (1,8)	14	1,63	1,70	5,04
3	-1 (0,1)	1 (3,7)	-1(0,4)	1 (1,8)	14	7,36	0,45	5,01
4	1 (0,8)	1 (3,7)	-1(0,4)	-1(0,2)	14	0,64	4,83	5,07
5	-1 (0,1)	-1 (0,5)	1 (3,0)	1 (1,8)	14	5,47	0,30	5,00
6	1 (0,8)	-1 (0,5)	1 (3,0)	-1(0,2)	14	1,28	1,71	5,04
7	-1 (0,1)	1 (3,7)	1 (3,0)	-1(0,2)	14	1,42	1,26	5,03
8	1 (0,8)	1 (3,7)	1 (3,0)	1 (1,8)	8	4,61	0,42	5,05
9*	0 (0,5)	0 (2,1)	0 (1,7)	0 (1,0)	14	3,83	0,63	4,99
10*	0 (0,5)	0 (2,1)	0 (1,7)	0 (1,0)	14	5,91	0,42	5,03
11*	0 (0,5)	0 (2,1)	0 (1,7)	0 (1,0)	14	1,31	1,16	5,01

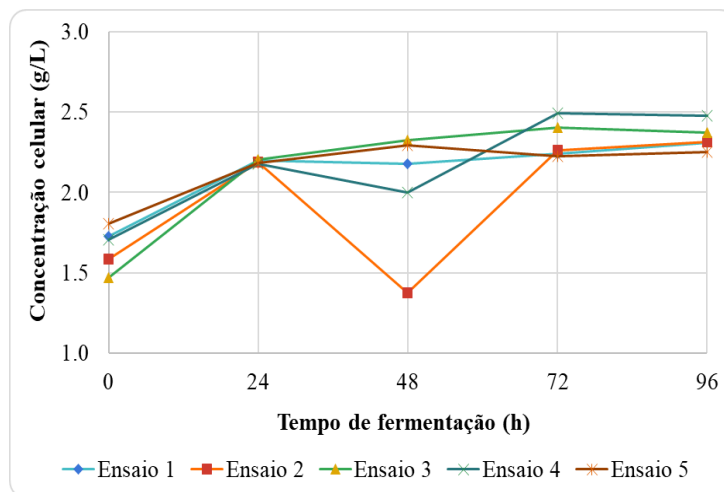
Fonte. Próprio Autor.

Entre as condições avaliadas, o ensaio 4 apresentou a maior concentração celular (2,45 g/L) após cinco dias de fermentação, suplementado com 0,8 g/L de ureia, 3,7 g/L de extrato de levedura, 0,4 g/L de peptona e 0,2 g/L de sulfato de amônio, correspondendo a uma razão C/N de 14. Nessa condição, observou-se o menor consumo de açúcares (0,64%) e o maior valor de Y_{X/S} (4,83), sugerindo melhor conversão do substrato em biomassa entre os ensaios fermentativos realizados. Esse comportamento indica que a condição intermediária de C/N favoreceu o equilíbrio entre disponibilidade de nitrogênio e assimilação de carbono, promovendo crescimento celular sem limitação excessiva do nutriente.

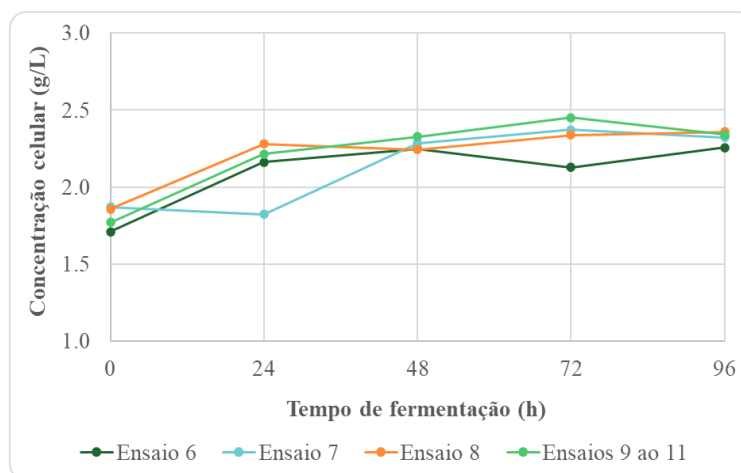
Por outro lado, o ensaio 1, conduzido com as menores concentrações das fontes nitrogenadas (C/N=64), apresentou o maior consumo de açúcares (7,90%), com concentração celular de 2,31 g/L e Y_{X/S} de 0,31. Essa condição, caracterizada por alta relação C/N (baixo nitrogênio), levou a um consumo mais acentuado de substrato, porém com menor eficiência de conversão, possivelmente devido à limitação nitrogenada, que restringe a síntese de proteínas e, conseqüentemente, o crescimento celular. Assim, a comparação entre os experimentos 1 e 4 evidencia que uma razão C/N intermediária é mais favorável ao crescimento da *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 sob as condições avaliadas.

Figura 28. Concentração celular ao longo do tempo de fermentação para os experimentos: (a) 1 a 5 e (b) 6 a 11 do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} .

(a)



(b)



Fonte. Próprio Autor.

De forma geral, apesar do baixo consumo de açúcares obtido nos 11 ensaios fermentativos, observou-se que a diminuição da concentração das fontes de nitrogênio favoreceu o consumo de açúcares, embora nem sempre resultasse em maior concentração celular. A comparação entre os experimentos 1 (todas as fontes em menor nível) e 8 (todas em maior nível) reforça que uma razão C/N mais elevada (menor nitrogênio) tende a favorecer o consumo de açúcares, enquanto proporções intermediárias proporcionam melhor equilíbrio metabólico para crescimento celular eficiente.

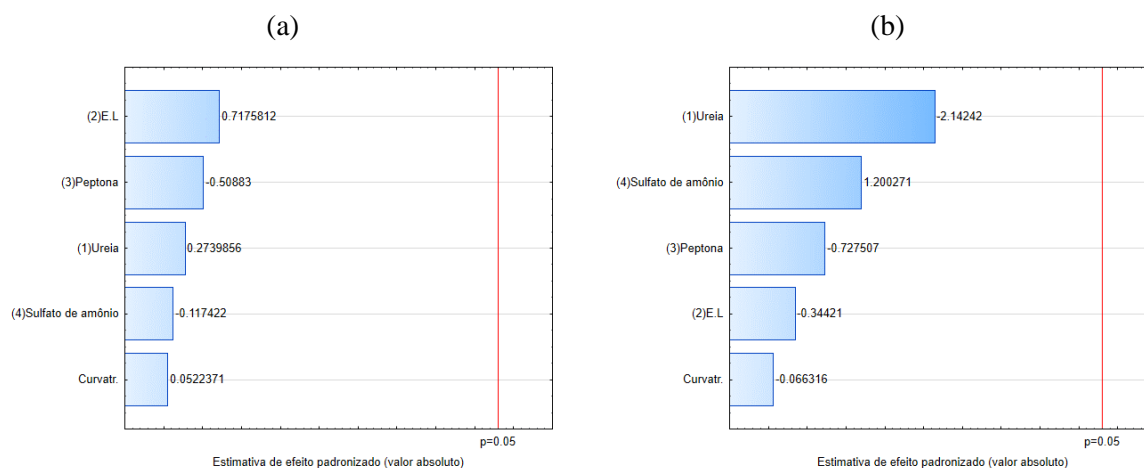
Os resultados obtidos estão em concordância com os relatados por Almeida *et al.* (2023)⁷², que avaliaram a mesma cepa (*R. toruloides* UFMG-CMY2781) cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar sem destoxificação. Nesse estudo, o

crescimento celular variou de 1,34 g/L a 2,28 g/L após cinco dias de fermentação utilizando suplementação com 2,0 g/L de E.L., 1 g/L de $MgSO_4$, 1 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ e 3 g/L de KH_2PO_4 (C/N = 26,3). Além disso, o pH manteve-se praticamente constante em torno de 5,0 durante todo o processo, comportamento semelhante ao observado nos 11 ensaios fermentativos do presente trabalho.

A análise estatística dos 11 experimentos, representada pelo diagrama de Pareto na Figura 29, revelou que nenhuma das variáveis avaliadas apresentou efeito significativo sobre as respostas estudadas e que o modelo não apresentou curvatura. Esse resultado sugere que as faixas de concentração testadas podem não ter sido suficientemente amplas para evidenciar diferenças estatisticamente relevantes. Além disso, a presença de compostos inibidores no hidrolisado não destoxificado pode ter limitado o crescimento celular, mascarando possíveis efeitos da variação da razão C/N.

Dessa forma, constata-se que a simples modificação da razão C/N não foi suficiente para otimizar o desempenho fermentativo da *R. toruloides* UFMG-CMY2781 em meio contendo hidrolisado hemicelulósico sem destoxificar. Estratégias complementares, como a adaptação gradativa da levedura ou pré-tratamentos adicionais do substrato, podem representar alternativas viáveis e economicamente interessantes para aprimorar a produtividade celular e lipídica^{15,107,108}.

Figura 29. Diagrama de Pareto, resultante dos efeitos padronizados do modelo de regressão, para a avaliação das fontes de nitrogênio na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificar pela levedura *R. toruloides* UFMG-CMY2781, considerando as variáveis resposta: (a) Concentração Celular e (b) consumo de açúcares após 96h de fermentação.



Fonte. Próprio Autor.

5.5 Extração dos lipídios microbianos referentes ao planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹.

Após a fermentação dos 11 experimentos conduzidos com diferentes concentrações das fontes de carbono e nitrogênio, as biomassas obtidas foram submetidas à secagem para posterior extração dos lipídios intracelulares. Contudo, conforme discutido anteriormente, o crescimento celular foi inferior ao esperado, o que resultou em uma baixa produção de biomassa e, conseqüentemente, em reduzido acúmulo de óleos microbianos. De acordo com a metodologia adotada para extração lipídica, é necessário um mínimo de 200 mg de massa seca de células para a realização adequada do procedimento. No entanto, essa quantidade não foi alcançada em nenhum dos 11 ensaios fermentativos devido ao baixo crescimento celular observado. Ainda assim, foram realizadas quantificações lipídicas para os experimentos 3, 5 e 10, nos quais foi possível obter aproximadamente 150 mg de biomassa seca (Tabela 8).

Tabela 8. Quantificação dos lipídios microbianos obtidos pela fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificar utilizando a levedura *R. toruloides* UFMG-CMY2781.

Experimento	Massa células (mg)	Conteúdo Lipídico (mg/g)	Concentração Lipídica (mg/L)	Produtividade (mg/L.h)
3	133,0	3,76	5,32	0,055
5	123,5	6,48	8,51	0,089
10	143,8	4,17	6,38	0,066

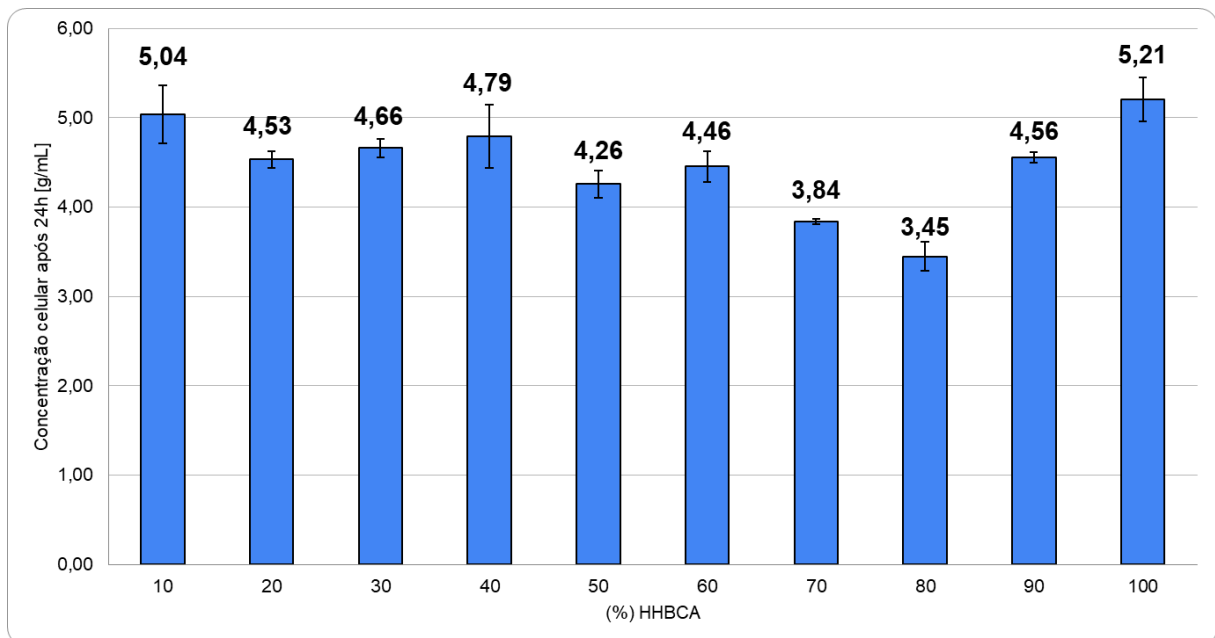
Fonte. Próprio Autor.

Almeida *et al.* (2023)⁷² obtiveram, com a mesma cepa de levedura (*R. toruloides* UFMG-CM-Y2781), um acúmulo lipídico de 77,56 mg/g em hidrolisado hemicelulósico proveniente da hidrólise ácida diluída de uma mistura 1:1 de bagaço e palha de cana-de-açúcar, contendo 3,8 g/L de glicose, 26,3 g/L de xilose, 3,77 g/L de ácido acético, 1,09 mg/L de vanilina e 4,9 mg/L de furfural, suplementado com 2,0 g/L de E.L., 1 g/L de MgSO₄·7H₂O, 2 g/L de (NH₄)₂SO₄ e 3 g/L de KH₂PO₄ após procedimento de adaptação. Esse valor é significativamente superior ao observado neste estudo, no qual a maior concentração lipídica foi de 6,48 mg/g (experimento 5). Isso indica que, nas condições analisadas, a levedura direcionou o consumo limitado de açúcares principalmente para a manutenção celular, e não para a síntese de óleos microbianos. Assim, para viabilizar uma produção lipídica mais eficiente, torna-se fundamental aplicar uma metodologia de adaptação que aumente a resistência da levedura aos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico.

5.6 Adaptação da levedura *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar 3 vezes concentrado.

Dessa forma, o cerne do projeto voltou-se à necessidade de adaptar a cepa utilizada em hidrolisado hemicelulósico três vezes concentrado, visando aumentar a resistência aos compostos inibidores presentes no hidrolisado pelo microrganismo. Portanto, realizou-se uma metodologia de adaptação gradativa da levedura em HHBCA concentrado três vezes (11,86 g/L glicose, 82,44 g/L xilose, 10,67 g/L arabinose, 6,56 g/L ácido acético e 2,19 g/L celobiose). Nesse experimento, inoculou-se a *R. toruloides* UFMG-CMY2781 em um meio sintético simulando as condições do hidrolisado e ao longo dos dias adicionou-se, gradualmente, 10% de HHBCA a cada 24h horas. Logo, obteve-se os resultados, de crescimento celular após 24h de fermentação em cada nível de adaptação (Figura 30). A Tabela 9 ilustra a quantidade de inibidores presentes no meio fermentativo em cada dia da metodologia de adaptação.

Figura 30. Concentração celular da *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 para cada nível de adaptação usando HHBCA.



Fonte. Próprio Autor.

Tabela 9. Quantidade de inibidores presentes no meio fermentativo em relação ao hidrolisado hemicelulósico não concentrado durante os dez dias de adaptação.

Dia	% HHBCA 3X	Quantidade de inibidores em relação ao HHBCA não concentrado
1	10%	0,3 X
2	20%	0,6 X
3	30%	0,9 X
4	40%	1,2 X
5	50%	1,5 X
6	60%	1,8 X
7	70%	2,1 X
8	80%	2,4 X
9	90%	2,7 X
10	100%	3,0 X

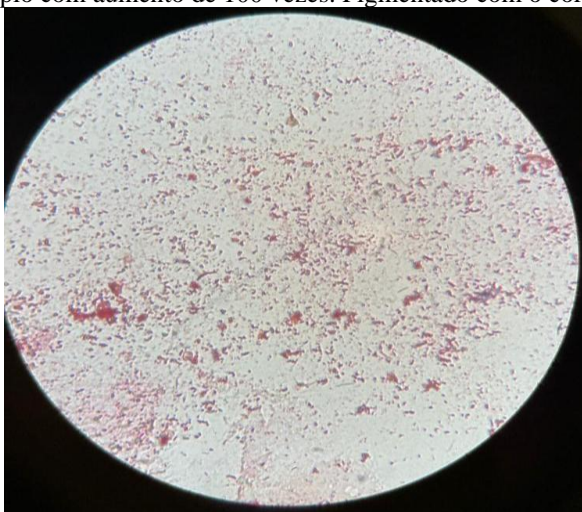
Fonte. Próprio Autor.

A análise dos dados evidencia que a *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 desenvolveu resistência aos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico, alcançando um crescimento celular de 5,21 g/L em meio contendo 100% de HHBCA concentrado três vezes. Esse resultado confirma a eficácia do processo de adaptação, visto que, na fermentação inicial realizada sob as mesmas condições de suplementação (0,8 g/L de ureia, 3,7 g/L de extrato de levedura, 0,4 g/L de peptona e 0,2 g/L de sulfato de amônio) o crescimento havia sido de apenas 2,45 g/L após 96 h. Assim, verifica-se que a levedura apresentou desempenho superior mesmo em um meio com maior concentração de inibidores, resultado diretamente associado à adaptação prévia ao hidrolisado concentrado.

5.7 Fermentação teste da adaptação da levedura *Rhodosporidium toruloides* UFMG-CM-Y2781 realizada em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar duas vezes concentrado.

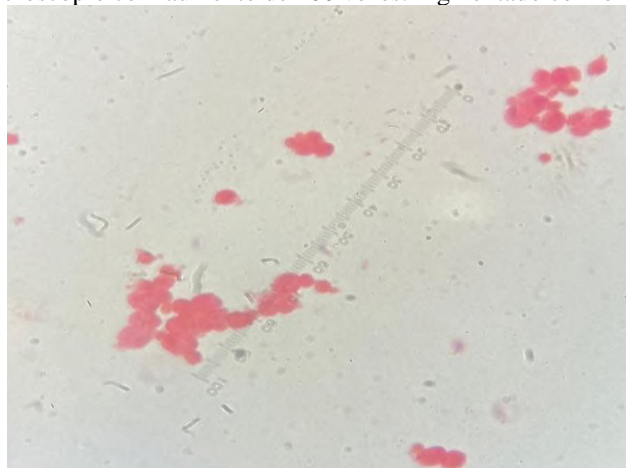
Após a realização da adaptação da levedura em hidrolisado hemicelulósico concentrado três vezes, foi feita uma fermentação com o microrganismo adaptado. Dessa forma, realizou-se a fermentação do hidrolisado hemicelulósico duas vezes concentrado (7,40 g/L glicose, 50,55 g/L xilose, 6,10 g/L arabinose, 5,52 g/L ácido acético e 1,37 g/L celobiose) usando a levedura *Rhodosporidium toruloides* UFMG-CM-Y2781 adaptada visando uma maior produtividade de lipídeos. As Figuras 31 a 33 apresentam imagens em microscópio da levedura no início e fim da fermentação teste.

Figura 31. Células da levedura *Rhodosporidium toruloides* UFMG-CM-Y2781 no início da fermentação vistas em um microscópio com aumento de 100 vezes. Pigmentado com o corante Safranina.



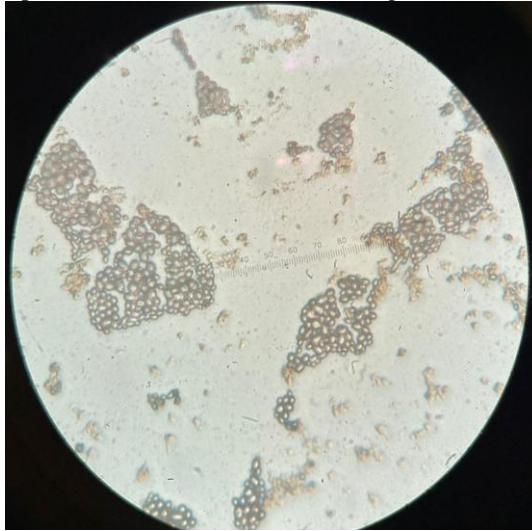
Fonte. Próprio Autor.

Figura 32. Células da levedura *Rhodospiridium toruloides* UFMG-CM-Y2781 após 96 horas de fermentação vistas em um microscópio com aumento de 100 vezes. Pigmentado com o corante Safranina.



Fonte. Próprio Autor.

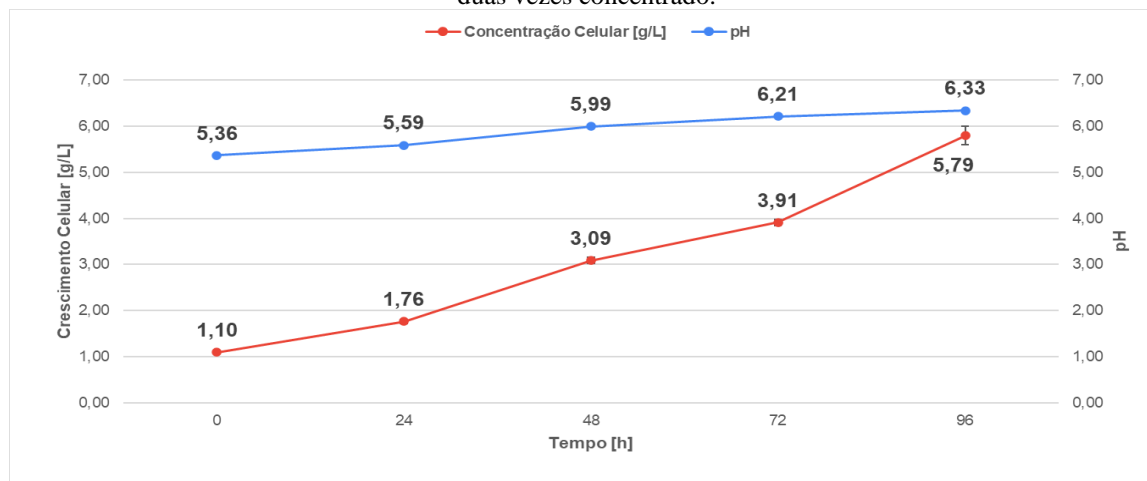
Figura 33. Células da levedura *Rhodosporidium toruloides* UFMG-CM-Y2781 após 96 horas de fermentação vistas em um microscópio com aumento de 100 vezes. Pigmentado com o corante Sudan IV.



Fonte. Próprio Autor.

Ao analisar os resultados obtidos de crescimento celular e pH ao decorrer do experimento, Figura 34, observa-se que a levedura obteve um crescimento bem maior do que todos os 11 ensaios fermentativos realizados no planejamento (Tabela 2). Após 96h de fermentação, a levedura adaptada cresceu até 5,79 g/L, contrapondo com o maior crescimento obtido no planejamento (2,45 g/L do ensaio 4, C/N = 14). Além disso, a variação do pH com o decorrer da fermentação também se alterou quando comparado com os ensaios do planejamento experimental (Tabela 2). No teste realizado, o pH do meio elevou-se com o decorrer do tempo, indicando o consumo de ácido acético pela levedura, comportamento abordado em Palmqvist *et al.* (2000)¹⁴, o que não foi observado no planejamento de experimentos (Tabela 2) uma vez que o pH se manteve constante.

Figura 34. Crescimento celular da *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 adaptada e pH do meio fermentativo, coletados em triplicata, durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar duas vezes concentrado.



Fonte. Próprio Autor.

Avaliou-se o consumo de açúcares pela *Rhodosporidium toruloides* UFMG-CM-Y2781 durante a fermentação, conforme apresentado na Tabela 10. Observa-se que a xilose praticamente não foi metabolizada (apenas 0,21%), enquanto 65,2% da glicose presente no hidrolisado hemicelulósico foi consumida pelo microrganismo. Esse comportamento pode ser explicado pelo fenômeno de repressão catabólica, no qual, na presença de diferentes açúcares, a *R. toruloides* prioriza o consumo da glicose antes de iniciar o metabolismo das pentoses, como a xilose^{10,15}.

Considerando que o principal objetivo deste trabalho é viabilizar o aproveitamento da xilose presente na fração hemicelulósica do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, pentose que representa cerca de 68,4% dos monômeros desse resíduo lignocelulósico, o fato de sua concentração ter se mantido praticamente constante requer uma análise mais detalhada dos resultados. A adaptação da levedura conferiu resistência aos compostos de degradação, permitindo maior multiplicação celular no meio fermentativo. Contudo, o consumo incompleto de glicose impediu que a xilose fosse posteriormente metabolizada, em virtude da já mencionada repressão catabólica. Dessa forma, é plausível supor que, embora a adaptação tenha aumentado a tolerância da levedura a ambientes mais tóxicos, ela não foi suficiente para possibilitar o consumo integral de glicose durante a fermentação em hidrolisado hemicelulósico duas vezes concentrado. A presença considerável de inibidores comprometeu a eficiência das vias responsáveis pela metabolização da glicose. Compostos como furfural, HMF, ácidos orgânicos e fenóis afetam enzimas da glicólise e do ciclo respiratório, além de causar desequilíbrio redox e danos às membranas celulares^{10,15}. Diante desse estresse, a levedura passa

a empregar parte da glicose disponível na geração de cofatores redutores, utilizados na conversão desses inibidores em compostos menos tóxicos. Nessas condições, o consumo de glicose torna-se mais lento e limitado, pois a levedura utiliza o substrato apenas para sustentar o metabolismo de manutenção, que demanda muito menos energia do que os processos de crescimento celular ou de acúmulo de lipídios na ausência de nitrogênio. Dessa forma, parte da glicose permaneceu no meio em razão da desaceleração metabólica provocada pela presença dos inibidores. Assim, embora a adaptação tenha aumentado a tolerância da *Rhodosporidium toruloides* UFMG-CM-Y2781 a ambientes inibitórios, ela não foi suficiente para manter um metabolismo ativo capaz de consumir integralmente os açúcares disponíveis para um crescimento celular ainda maior ou para a formação de lipídios.

Tabela 10. Concentração de glicose, xilose e ácido acético durante a fermentação da *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 adaptada em hidrolisado hemicelulósico duas vezes concentrado.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
0	8,32	41,36	6,88
96	2,89	41,27	7,09

Fonte. Próprio Autor.

Ao comparar o crescimento celular obtido neste trabalho com o estudo de Liu *et al.* (2020)¹⁰⁹, nota-se uma coerência nos resultados. Os autores avaliaram o crescimento de *R. toruloides* em hidrolisado de palha de trigo submetido a diferentes pré-tratamentos (destoxificado, concentrado e em meio sintético), obtendo concentrações celulares entre 4,50 e 17,95 g/L. De forma semelhante, neste estudo, foi alcançada uma concentração celular final de 5,79 g/L, demonstrando que o comportamento da levedura segue um padrão consistente mesmo em hidrolisados de origens distintas (palha de trigo versus bagaço e palha de cana-de-açúcar).

Portanto, o ensaio fermentativo com a levedura adaptada confirma que a *Rhodosporidium toruloides* UFMG-CM-Y2781 adquiriu resistência aos inibidores de crescimento, uma vez que apresentou maior crescimento celular em comparação aos ensaios do planejamento experimental na razão ótima C/N, mesmo em meio contendo o dobro da concentração de compostos tóxicos. Além disso, a concentração celular obtida está dentro da faixa relatada por Liu *et al.* (2020)¹⁰⁹. No entanto, a resistência adquirida não foi suficiente para promover o consumo de xilose no hidrolisado concentrado. Assim, é provável que a levedura adaptada apresente desempenho mais favorável em meio não concentrado, condição utilizada nos testes de definição da razão ótima C/N, uma vez que o meio teria metade da concentração

dos inibidores presentes no teste realizado. Em síntese, a adaptação gradativa mostrou-se uma estratégia promissora, e estudos futuros deverão focar na otimização da razão C/N de suplementação utilizando a levedura adaptada em hidrolisado hemicelulósico não concentrado.

5.8 Perspectivas de melhoria

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a adaptação gradativa da *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781 ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana-de-açúcar (HHBCA) permitiu um aumento no crescimento celular mesmo em meios fermentativos com concentrações de inibidores duas a três vezes maiores. Entretanto, a levedura ainda não foi capaz de consumir a xilose de forma efetiva, principal açúcar presente na fração hemicelulósica, o que limita a conversão total dos açúcares em biomassa e lipídios. Dessa forma, novas estratégias podem ser adotadas visando otimizar o desempenho fermentativo e o acúmulo lipídico da levedura.

Uma das principais perspectivas consiste em avaliar novas relações C/N utilizando a levedura previamente adaptada em hidrolisado não concentrado. A literatura aponta que valores de C/N mais elevados favorecem o metabolismo lipogênico em *R. toruloides*, promovendo maior acúmulo de triacilgliceróis (TAGs). O estudo de Lopes *et al.* (2020)¹¹⁰ relatou que relações C/N entre 60 e 100 são ideais para maximizar o acúmulo lipídico, enquanto Wiebe *et al.* (2012)¹¹¹ cultivaram *R. toruloides* sob razões de C/N variando de 40 a 100 e observaram que o aumento da razão C/N elevou o teor de lipídios na biomassa, atingindo de 52% a 75% em meio com limitação de nitrogênio. Os autores destacaram que as condições intermediárias (C/N 65–80) apresentaram o melhor balanço entre rendimento lipídico e produtividade. Assim, sugere-se que experimentos futuros sejam conduzidos com C/N=80, uma vez que esse valor tende a equilibrar o crescimento celular, já favorecido pela adaptação, e o início da fase lipogênica, promovendo uma maior conversão de açúcares em lipídios.

Outra possibilidade de melhoria envolve a redução dos compostos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico, uma vez que o ácido acético e o ácido fórmico foram identificados como os principais inibidores de crescimento da levedura. Nesse contexto, recomenda-se a aplicação de métodos de destoxificação físico-químicos ou biológicos. A utilização do método do *overliming* em conjunto com o carvão ativado é uma possibilidade que busca reduzir significativamente a toxicidade do meio, aumentando o consumo de açúcares e a produtividade de lipídios.

Adicionalmente, pode-se considerar a implementação de um método adicional de pré-tratamento da biomassa, com o objetivo de melhorar a eficiência de hidrólise e reduzir a formação de compostos de degradação. O uso combinado de pré-tratamentos físico-químicos, como explosão a vapor seguida de hidrólise ácida diluída, pode favorecer uma liberação mais seletiva dos açúcares da hemicelulose, diminuindo simultaneamente a formação de inibidores derivados da lignina.

Por fim, após novos testes alcançarem crescimento celular e produção lipídica satisfatórios em escala laboratorial, o próximo passo consiste no escalonamento em biorreatores, permitindo avaliar o comportamento da levedura em condições controladas de maior volume. Dessa forma será possível analisar parâmetros de operação como agitação, aeração, pH e temperatura, bem como identificar limitações de transferência de oxigênio e impactos de inibidores residuais do HHBCA. Um possível escalonamento fornecerá dados para estimativas de produtividade e rendimento, consolidando a viabilidade técnica e econômica da produção de lipídios microbianos a partir do HHBCA em escala industrial.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem afirmar que o hidrolisado hemicelulósico proveniente da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (HHBCA) apresenta potencial para ser utilizado como substrato alternativo em bioprocessos envolvendo a levedura *Rhodospiridium toruloides* UFMG-CM-Y2781. A caracterização físico-química do hidrolisado confirmou perfis composicionais coerentes com dados da literatura, evidenciando a presença predominante de ácido acético como principal composto inibidor, seguido por derivados fenólicos oriundos da degradação da lignina, como siringaldeído e ácido 2,4-dihidroxibenzoico.

No planejamento experimental voltado à determinação das condições ótimas de suplementação de fontes de carbono e nitrogênio, a máxima concentração celular atingida foi de 2,45 g/L após 120 horas de fermentação, para uma razão C/N igual a 14. Apesar de ter ocorrido crescimento celular, a produtividade lipídica foi reduzida, indicando que, nas condições avaliadas, os carboidratos disponíveis foram majoritariamente direcionados à manutenção metabólica, e não às rotas de acúmulo de lipídios.

Considerando esse desempenho limitado e a presença significativa de compostos inibidores no HHBCA, implementou-se uma estratégia de adaptação gradativa da levedura. Os resultados demonstraram que *Rhodospiridium toruloides* UFMG-CM-Y2781 adaptada apresentou desempenho celular superior, alcançando 5,2 g/L após apenas 96 horas de fermentação em meio contendo hidrolisado três vezes concentrado. Esses dados confirmam que o processo de adaptação permitiu aumentar a tolerância da cepa aos inibidores presentes no hidrolisado. Contudo, apesar dessa melhora expressiva no crescimento celular, o consumo de xilose permaneceu limitado, sugerindo que mecanismos associados à repressão catabólica e à toxicidade residual ainda restringem a metabolização plena das pentoses.

Dessa forma, conclui-se que a adaptação gradativa constitui uma abordagem promissora para aprimorar o desempenho de leveduras oleaginosas em hidrolisados lignocelulósicos. Para avançar em direção à obtenção de produtividades lipídicas mais representativas, recomenda-se a continuidade das investigações envolvendo: (i) otimização da razão C/N para a cepa adaptada; (ii) avaliação de métodos complementares de detoxificação física, química ou biológica; e (iii) aperfeiçoamento das condições de pré-tratamento a fim de minimizar a geração de compostos inibidores.

Adicionalmente, estudos futuros devem contemplar a condução das fermentações em biorreatores, permitindo maior controle das variáveis operacionais, avaliação de perfis cinéticos e o início da construção de bases para o escalonamento industrial.

Finalmente, este trabalho contribui significativamente para o avanço do conhecimento sobre o uso de resíduos agroindustriais como matéria-prima para bioprocessos, reafirmando o potencial da *Rhodospiridium toruloides* como microrganismo de interesse estratégico em rotas biotecnológicas alinhadas aos princípios da economia circular e da sustentabilidade no setor sucroenergético.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION. **State of the Global Climate 2024**. WMO-No. 1368. Geneva: WMO, 2025. Disponível em: https://public.wmo.int/sites/default/files/2025-03/WMO-1368-2024_en.pdf.

² EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Synthesis of the National Energy Balance – BEN 2025**. Rio de Janeiro: EPE, 2025. Disponível em: https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-885/topico-767/BEN_S%C3%ADntese_2025_EN.pdf

³ MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, ago. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>

⁴ CYPRIANO, D. Z.; DA SILVA, L. L.; MARIÑO, M. A.; TASIC, L. A Biomassa da Laranja e seus Subprodutos. **Rev. Virtual Quim.**, v. 9, n. 1, p. 176-191, 2017. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/TasicNoPrelo.pdf>

⁵ PAULA, M. O.; TINÔCO, I. D.; RODRIGUES, C. D.; SILVA, E. M.; SOUZA, C. D. Potencial da cinza do bagaço da cana-de-açúcar como material de substituição parcial de cimento Portland. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 353-357, 2009. Disponível em: <https://locus.ufv.br/items/52c5a07c-1245-47d8-9707-ea5c0cc8c2d9>

⁶ UNITED NATIONS. **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development**. New York: United Nations, 2015. Disponível em: <https://sdgs.un.org/2030agenda>

⁷ UNITED NATIONS. **The 17 Goals – Sustainable Development Goals**. United Nations, 2025. Disponível em: <https://sdgs.un.org/goals>

⁸ GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 582–587, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300004>

⁹ MOREIRA, J. R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, v. 27, n. 4, p. 229-245, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0301-4215\(99\)00005-1](https://doi.org/10.1016/S0301-4215(99)00005-1)

¹⁰ ALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 17-24, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852499001601>

¹¹ HU, C.; ZHAO, X.; ZHAO, J.; WU, S.; ZHAO, Z. K. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 20, p. 4843–4847, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.041>

¹² DE SOUZA, N. M.; BELLINI, J. R.; SOUSA, D. de A.; BROD, F. C. A.; MARIOTTO, S.; DA SILVA, R. O. Eficiência da hidrólise ácida e explosão a vapor na liberação de pentoses e hexoses de resíduos agroindustriais. **Revista Contemporânea**, v. 3, n. 8, p. 12078–12095, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.56083/RCV3N8-117>

- ¹³ IBRAHEEM, O.; NDIMBA, B. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocellulose-derived inhibitory compounds. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 598–612, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijbs.6091>
- ¹⁴ 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. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- ¹⁵ LIU, Z.; RADİ, M.; MOHAMED, E. T. T.; FEIST, A. M.; DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I. Adaptive laboratory evolution of *Rhodospiridium toruloides* to inhibitors derived from lignocellulosic biomass and genetic variations behind evolution. **Bioresource Technology**, v. 333, 125171, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125171>
- ¹⁶ CASTAÑEDA, M. T.; NUÑEZ, S.; GARELLI, F.; VOGET, C.; DE BATTISTA, H. Comprehensive analysis of a metabolic model for lipid production in *Rhodospiridium toruloides*. **Journal of Biotechnology**, v. 280, p. 11–18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.010>
- ¹⁷ LI, Y.; ZHAO, Z. (K.); BAI, F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 312–317, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.008>
- ¹⁸ LAKSHMIDEVI, R.; RAMAKRISHNAN, B.; RATHA, S. K.; BHASKAR, S.; CHINNASAMY, S. Valorisation of molasses by oleaginous yeasts for single cell oil (SCO) and carotenoids production. **Environmental Technology and Innovation**, v. 21, 101281, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101281>
- ¹⁹ GAO, R.; ZHANG, H.; XIONG, L.; LI, H.; CHEN, X.; WANG, M.; CHEN, X. Fermentation performance of oleaginous yeasts on *Eucommia ulmoides* Oliver hydrolysate: impacts of the mixed strains fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 366, n. 2, p. 10–18, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2023.02.009>
- ²⁰ ZHAO, X.; PENG, F.; DU, W.; LIU, C.; LIU, D. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 993–1004, 2012.
- ²¹ UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Sugar Annual - Brazil 2025**. USDA FAS, 2025. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Sugar%20Annual_Brasilia_Brazil_BR2025-0011.pdf
- ²² LABORATÓRIO NACIONAL DE BIORRENOVÁVEIS – LNBR / CNPem. **Sugarcane straw and bagasse**. Disponível em: <https://lnbr.cnpem.br/biovalue/biovalue-biomasses/sugarcane-straw-bagasse/>
- ²³ REIN, P. **Engenharia do Açúcar de Cana**. Berlim: Verlag Dr. Albert Bartens KG, 2013.
- ²⁴ OGURA, A. P.; DA SILVA, A. C.; CASTRO, G. B.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; DA SILVA, A. L. An overview of the sugarcane expansion in the state of São Paulo (Brazil) over the last

two decades and its environmental impacts. **Sustainable Production and Consumption**, v. 32, p. 66-75, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.spc.2022.04.010>

²⁵ IRANOBE, C. T.; GOMES, A. S.; PAIVA, F. F. G.; TOLOSA, G. R.; PAIM, L. L.; DOGNANI, G.; CARDIM, G. P.; CARDIM, H. P.; DOS SANTOS, R. J.; CABRERA, F. C. Sugarcane Bagasse: Challenges and Opportunities for Waste Recycling. **Clean Technologies**, v. 6, n. 2, p. 662-699, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cleantechnol6020035>

²⁶ MAHMUD, M. A.; ANANNYA, F. R. Sugarcane bagasse: a source of cellulosic fiber for diverse applications. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 15, p. 1136–1146, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8379461/>

²⁷ RAÍZEN. **Raízen inaugura maior planta de Etanol de Segunda Geração do mundo**. Guariba, SP, 2024. Disponível em: <https://www.raizen.com/sala-de-imprensa/raizen-inaugura-maior-planta-de-etanol-de-segunda-geracao-do-mundo>

²⁸ REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 22-27, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.002>

²⁹ SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337-353, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>

³⁰ ABUTALEB, A.; TAYEB, A. M.; MAHMOUD, M. A.; DAHER, A. M.; DESOUKY, O. A.; BAKATHER, O. Y.; FAROUQ, R. Removal and recovery of U(VI) from aqueous effluents by flax fiber: adsorption, desorption and batch adsorber proposal. **Journal of Advanced Research**, v. 22, p. 153-162, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.10.011>

³¹ VIAMAJALA, S.; DONOHOE, B. S.; DECKER, S. R.; VINZANT, T. B.; SELIG, M. J.; HIMMEL, M. E.; TUCKER, M. P. Heat and mass transport in processing of lignocellulosic biomass for fuels and chemicals. In: **Sustainable biotechnology**, Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 1-18. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-3295-9_1

³² BRIENZO, M.; FIKIZOLO, S.; BENJAMIN, Y.; TYHODA, L.; GÖRGENS, J. Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable Energy**, v. 104, p. 271-280, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.12.037>

³³ FAN, J.; LU, Y.; AN, N.; ZHU, W.; LI, M.; GAO, M.; WANG, X.; WU, C.; WANG, Y. Pretreatment technologies for lignocellulosic biomass: research progress, mechanisms, and prospects. **BioResources**, v. 20, n. 2, p. 4897-4924, 2025. Disponível em: <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/pretreatment-technologies-for-lignocellulosic-biomass-research-progress-mechanisms-and-prospects/>

³⁴ TEIXEIRA, R. S. S.; SILVA, A. S.; MOUTTA, R. O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BARROS, R. R. O.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S. Biomass pretreatment: a critical choice for biomass utilization via biotechnological routes. **BMC Proceedings**, v. 8, Supplement 4, p.

O34, 2014. Disponível em: <https://bmcproc.biomedcentral.com/articles/10.1186/1753-6561-8-S4-O34>

³⁵ SHIMIZU, F. L. **Remoção de lignina e hemicelulose: influência na acessibilidade à celulose e sacarificação enzimática**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Rio Claro, Rio Claro, 2018. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/11449/153394/5/shimizu_fl_me_rcla.pdf

³⁶ SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1–11, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)

³⁷ MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>

³⁸ TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621–1651, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>

³⁹ JIMENEZ-GUTIERREZ, J. M.; VERLINDEN, R. A. J.; VAN DER MEER, P. C.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; STRAATHOF, A. J. J. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass at lab and pilot scale. **Processes**, v. 9, n. 9, art. 1518, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr9091518>

⁴⁰ LI, M.; CAO, S.; MENG, X.; STUDER, M.; WYMAN, C. E.; RAGAUSKAS, A. J.; PU, Y. The effect of liquid hot water pretreatment on the chemical–structural alteration and the reduced recalcitrance in poplar. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, art. 237, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0926-6>

⁴¹ DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K. T.; MAO, C.; QIN, W. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 302–309, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.490938>

⁴² YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.; WYMAN, C. E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v. 2, n. 4, p. 421–450, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/BFS.11.116>

⁴³ KUMAR, V. A.; KURUP, S.; SNISHAMOL, C.; PRABHU, G. Role of cellulases in food, feed, and beverage industries: enzymes in industrial food processing. In: **Green Bio-process**, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_17

⁴⁴ ISTASSE, T. **Synthesis of furan derivatives from monosaccharides in reaction media based on choline chloride**. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias e Engenharia Biológica) – University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Liège, 2021.

⁴⁵ FULIGNATI, S.; LICURSI, D.; DI FIDIO, N.; ANTONETTI, C.; GALLETI, A.. Novel Challenges on the Catalytic Synthesis of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) from Real

Feedstocks. **Catalysts**, v. 12, p. 1664, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal12121664>

⁴⁶ TSEGAYE, K. N.; MAREW, A.; BERHANE, N. *Saccharomyces cerevisiae* for lignocellulosic ethanol production: a look at key attributes and genome shuffling. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, 25 set. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1466644>

⁴⁷ JEON, W. Y.; YOON, B. H.; KO, B. S.; SHIM, W. Y.; KIM, J. H. Xylitol production is increased by expression of codon-optimized *Neurospora crassa* xylose reductase gene in *Candida tropicalis*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 191–198, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0618-8>

⁴⁸ FEI, Q.; O'BRIEN, M.; NELSON, R.; CHEN, X.; LOWELL, A.; DOWE, N. Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 130, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0542-x>

⁴⁹ ZHANG, Y.; LI, M.; ZHU, R.; XIN, Y.; GUO, Z.; GU, Z.; GUO, Z.; ZHANG, L. Installing xylose assimilation and cellodextrin phosphorolysis pathways in obese *Yarrowia lipolytica* facilitates cost-effective lipid production from lignocellulosic hydrolysates. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 16, art. 186, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02434-9>

⁵⁰ BOSE, P. Bacterial growth curve phases and assessment methods. **The Scientist**, 3 out. 2025. Disponível em: <https://www.the-scientist.com/bacterial-growth-curve-phases-and-assessment-methods-73524>. Acesso em: 8 nov. 2025

⁵¹ PHARMANOTES. **Microbial Growth – Phases and Kinetics**. 2022. Disponível em: <https://pharmanotes.org/2022/06/microbial-growth/>

⁵² XIA, M; LI, Y; CHEN, S. Fermentation trip: amazing microbes, amazing metabolisms. **Annals of Microbiology**, v. 68, p. 543–551, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1384-5>

⁵³ MARTÍNEZ, J. L.; STOGIOS, P. J.; SAVCHUK, S. C. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 1337–1351, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20210692>

⁵⁴ GONZÁLEZ-GARCÍA, Y.; RÁBAGO-PANDURO, L. M.; FRENCH, T.; CAMACHO-CÓRDOVA, D. I.; GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ, P.; CÓRDOVA, J. High lipids accumulation in *Rhodospiridium toruloides* by applying single and multiple nutrients limitation in a simple chemically defined medium. **Annals of Microbiology**, v. 67, p. 519-527, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1282-2>

⁵⁵ YE, Z.; SUN, T.; HAO, H.; HE, Y.; LIU, X.; GUO, M.; CHEN, G. Optimising nutrients in the culture medium of *Rhodospiridium toruloides* enhances lipids production. **AMB Express**, v. 11, art. 149, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01313-6>

⁵⁶ MISHRA, S.; DEEWAN, A.; ZHAO, H.; RAO, C. V. Nitrogen starvation causes lipid remodeling in *Rhodotorula (Rhodospiridium) toruloides*. **Microbial Cell Factories**, v. 23, art. 24, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02414-0>

- ⁵⁷ ALTERTHUM, F.; et al. **Biotechnologia industrial: Volume I, Fundamentos**. São Paulo, SP, Brazil: Blucher, 2001.
- ⁵⁸ OFEOEDUM, A. F.; UYANWA, N. C.; CHIKELU, E. C.; IROAGBA, L. N.; ANA EKE, E. J.; ODEYEMI, T. A.; OKEZIE, F. P.; NWUKA, M. U. Primary and Secondary Metabolites as Products of Microbial Metabolism: Uses and Application in Foods, Pharmaceutical and Allied Industries. A Review. **European Journal of Applied Science, Engineering and Technology**, v. 2, n. 2, p. 4-16, Mar.-Apr. 2024. Disponível em: [https://doi.org/10.59324/ejaset.2024.2\(2\).01](https://doi.org/10.59324/ejaset.2024.2(2).01)
- ⁵⁹ WALKER, G. M. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, art. 30, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- ⁶⁰ ORAIS, D. V; BASTOS, R. G. Citric acid production by *Aspergillus niger* from sugarcane bagasse with vinasse at different bed heights in packed-bed column. **Ambiência – Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 15, n. 2, p. 368-378, Maio/Ago. 2019. Disponível em: <https://revistas.unicentro.br/index.php/ambiencia/article/view/5925>
- ⁶¹ SÁNCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Secondary Metabolites. **Comprehensive Biotechnology**, 2. ed., v. 1, p. 155-167. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00018-0>
- ⁶² PINHEIRO, M. J.; BONTURI, N.; BELOUAH, I.; MIRANDA, E. A.; LAHTVEE, P.-J. Xylose metabolism and the effect of oxidative stress on lipid and carotenoid production in *Rhodotorula toruloides*: insights for future biorefinery. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, art. 1008, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.01008>
- ⁶³ N S., SUPRIYA. Difference Between Primary and Secondary Metabolites (with Comparison Chart). **Biology Reader**, 2025. Disponível em: <https://biologyreader.com/difference-between-primary-and-secondary-metabolites.html>
- ⁶⁴ LÓPEZ, J. M. S.; VANDEPUTTE, M.; VAN BOGAERT, I. N. A. Oleaginous yeasts: Time to rethink the definition? **Yeast**, v. 39, n. 11-12, p. 553-606, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/yea.3827>
- ⁶⁵ CAPORUSSO, A.; CAPECE, A.; DE BARI, I. Oleaginous Yeasts as Cell Factories for the Sustainable Production of Microbial Lipids by the Valorization of Agri-Food Wastes. **Fermentation**, v. 7, n. 2, p. 50, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation7020050>
- ⁶⁶ BELN, F.; CHUCK, C. J. The history, state of the art and future prospects for oleaginous yeast research. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 221, 2021. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-021-01712-1>
- ⁶⁷ TECHNICAL UNIVERSITY OF MUNICH. **Associate Professorship of Fungal Biotechnology in Wood Science**. Laboratory (imagem), [s.d.]. Disponível em: <https://www.lse.ls.tum.de/en/fungbio/gallery/laboratory/>. Acesso em: 10 nov. 2025.
- ⁶⁸ HUANG, X.-F.; LIU, J.-N.; LU, L.-J.; PENG, K.-M.; YANG, G.-X.; LIU, J. Culture strategies for lipid production using acetic acid as sole carbon source by *Rhodospiridium*

toruloides. **Bioresource Technology**, v. 206, p. 141-149, abr. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26851898/>

⁶⁹ SAINI, R.; HEGDE, K.; OSORIO-GONZALEZ, C. S.; BRAR, S. K.; VÉZINA, P. Evaluating the potential of *Rhodospiridium toruloides*-1588 for high lipid production using undetoxified wood hydrolysate as a carbon source. **Energies**, v. 13, n. 22, p. 5960, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1073/13/22/5960>

⁷⁰ CORADETTI, S. T.; PINEL, D.; GEISELMAN, G. M.; ITO, M.; MONDO, S. J.; REILLY, M. C.; CHENG, Y.-F.; BAUER, S.; GRIGORIEV, I. V.; GLADDEN, J. M.; SIMMONS, B. A.; BREM, R. B.; ARKIN, A. P.; SKERKER, J. M. Functional genomics of lipid metabolism in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. **eLife**, v. 7, p. e32110, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.32110>

⁷¹ ZHANG, Y.; KAMAL, R.; LI, Q.; YU, X.; WANG, Q.; ZHAO, Z.K. Comparative Fatty Acid Compositional Profiles of *Rhodotorula toruloides* Haploid and Diploid Strains under Various Storage Conditions. **Fermentation**, v. 8, p. 467, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation8090467>.

⁷² ALMEIDA, S. G. C.; SOUZA, J. P.; FOGARIN, H. M.; FRANCA, B. V.; DUSSÁN, K. J. Growth characterization of adapted *Rhodospiridium toruloides* in sugarcane biomass hemicellulosic hydrolysate. **Waste & Biomass Valorization**, 2023. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Growth-characterization-of-adapted-Rhodospiridium-Almeida-Fogarin/b94f497a6fd67369da332689487a3235bc043ccf>

⁷³ SHEN, H.; JIN, G.; HU, C.; GONG, Z.; BAI, F.; ZHAO, Z. K. Effects of dilution rate and carbon-to-nitrogen ratio on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* under chemostat conditions. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 28, n. 1, p. 56–64, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22667109/>

⁷⁴ WEN, Z.; ZHANG, S.; ODOH, C. K.; JIN, M.; ZHAO, Z. K. *Rhodospiridium toruloides* – a potential red yeast chassis for lipids and beyond. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa038>

⁷⁵ FERNANDES, R. **Oxidação metabólica da glicose**. fev. 2014. Disponível em: <https://rubenpereirafernandes.wordpress.com/2014/02/10/oxidacao-metabolica-da-glicose/>

⁷⁶ OTTONE, M. de O.; PANTOJA, L.; SANTOS, A. Micro-organismos fermentadores de pentoses: produção de etanol lignocelulósico. In: **Pesquisas científicas e o ensino de química**. Cap. 8. Ponta Grossa: Atena Editora, 2022. p. 474. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/360971984_Micro-organismos_fermentadores_de_pentoses_producao_de_etanol_lignocelulosico

⁷⁷ MAZA, D.; VIÑARTA, S.; SU, Y.; GUILLAMON, J.; AYBAR, M. Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts. **Journal of Biotechnology**, v. 310, p. 12–20, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.01.012>

⁷⁸ HERNANDEZ, G.; MÜLLER, B.; CHMIELARZ, M.; BRANDT, C.; HÖLZER, M.; VIEHWEGER, A.; PASSOTH, V. Chromosome-level genome assembly and transcriptome-based annotation of the oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides* CBS 14.

Genomics, v. 113, p. 4022–4027, 2021. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.10.006>

⁷⁹ WU, T.; YU, X.; HU, A.; ZHANG, L.; JIN, Y.; ABID, M. Ultrasonic disruption of yeast cells: underlying mechanism and effects of processing parameters. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 28, p. 59-65, 2015. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.01.005>

⁸⁰ CHEN, Y.; HUANG, Q.; YE, J.; XU, J.; CHEN, J.; WANG, Y.; NIE, X. Study on hydrothermal liquefaction for cell disruption and lipid extraction from *Rhodospiridium toruloides*. **Sustainable Energy & Fuels**, v. 5, p. 6029-6039, 2021. Disponível em:
<https://doi.org/10.1039/D1SE01254A>

⁸¹ JIN, G.; YANG, F.; HU, C.; SHEN, H.; ZHAO, Z. K. Enzyme-assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 378–382, maio 2012. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.152>

⁸² BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/o59-099>

⁸³ SAINI, R. K.; PRASAD, P.; SHANG, X.; KEUM, Y. S. Advances in lipid extraction methods - A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13643, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms222413643>

⁸⁴ WU, C; HONDA, K; FUJIYAMA, K. Current advances in alteration of fatty acid profile in *Rhodospiridium toruloides*: a mini-review. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 234, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03595-3>

⁸⁵ YANG, R. **The protective effect of oil on bacterial thermal inactivation in high-fat low-moisture foods: mechanisms and solutions**. Tese (Doutorado em Engenharia de Sistemas Biológicos) – Washington State University, 2020. Disponível em:
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20831.79529>

⁸⁶ **PUBCHEM**. PubChem. National Center for Biotechnology Information (NCBI), [s.d.]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 10 nov. 2025.

⁸⁷ MEYER, T.; KNITTELFELDER, O.; SMOLNIG, M.; ROCKENFELLER, P. Quantifying yeast lipidomics by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) and comparison to mass spectrometry-based shotgun lipidomics. **Microbial Cell**, v. 11, p. 57-68, 2024. Disponível em: <https://microbialcell.com/researcharticles/2024a-meyer-microbial-cell/>

⁸⁸ PATEL, A.; ANTONOPOULOU, I.; ENMAN, J.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P.; MATSAKAS, L. Lipids detection and quantification in oleaginous microorganisms: an overview of the current state of the art. **BMC Chemical Engineering**, v. 1, p. 1-17, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s42480-019-0013-9>

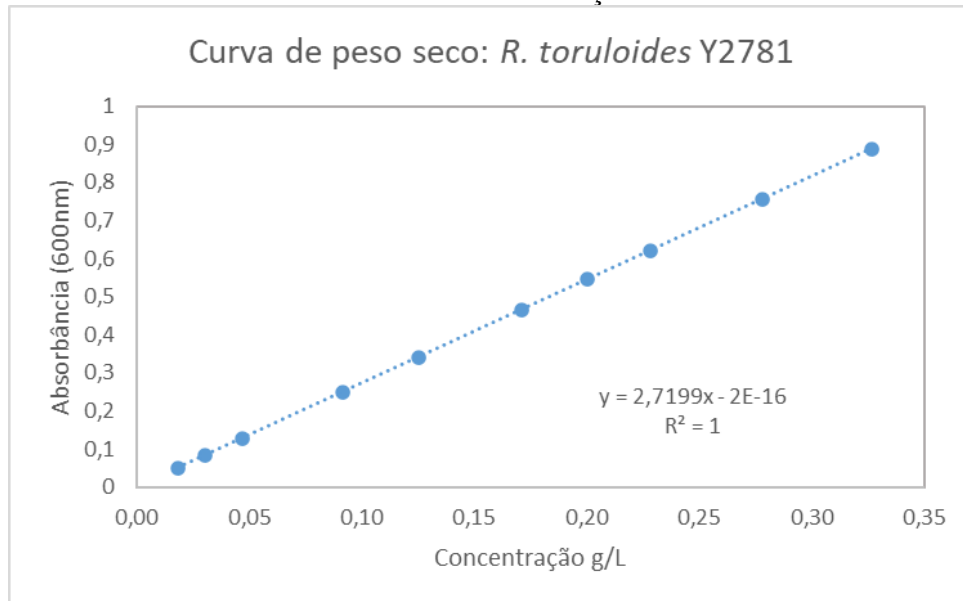
⁸⁹ HÖLZL, G.; DÖRMANN, P. Thin-Layer Chromatography. In: **Plant Lipids: Methods and Protocols**, vol. 2295. Clifton, NJ: Springer, 2021. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/351951207_Thin-Layer_Chromatography.

- ⁹⁰ MEYER, T.; KNITTELFELDER, O.; SMOLNIG, M.; ROCKENFELLER, P. Quantifying yeast lipidomics by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) and comparison to mass spectrometry-based shotgun lipidomics. **Microb Cell**, v. 11, p. 57-68, 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10879857/>
- ⁹¹ ICHIHARA, K.; FUKUBAYASHI, Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 3, p. 635–640, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19759389/>
- ⁹² FAROBIE, O.; SAMANMULYA, T.; MATSUMURA, Y. Application of spiral reactor for biodiesel production in supercritical methanol and ethanol: process evaluation. In: **ASIAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY AND SUSTAINABILITY (ACBS2016)**, Niigata, Japan. 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/316408650_Application_of_spiral_reactor_for_biodiesel_production_in_supercritical_methanol_and_ethanol_process_evaluation
- ⁹³ DIC CORPORATION. **Algal-derived DHA Oil (DHA510)**. 2025.[s.d]. Disponível em: <https://www.dic-global.com/en/products/dha510/>
- ⁹⁴ AMYRIS. **Neossance™ Squalane: ficha técnica / descrição de produto**. 2024. Disponível em: <https://www.specialchem.com/cosmetics/product/amyris-neossance-squalane>
- ⁹⁵ DIAO, Z.; ROELANTS, S. L. K. W.; LUYTEN, G.; et al. Revision of the sophorolipid biosynthetic pathway in *Starmerella bombicola* based on new insights in the substrate profile of its lactone esterase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 17, p. 89, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02533-1>
- ⁹⁶ UPRETY, B. K.; REDDY, J. V.; DALLI, S. S.; RAKSHIT, S. K. Utilization of microbial oil obtained from crude glycerol for the production of polyol and its subsequent conversion to polyurethane foams. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 309-315, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852417304078>
- ⁹⁷ SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; NREL, D. C. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. 2012. Disponível em: <https://docs.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>
- ⁹⁸ ALMEIDA, S.G.C., MELLO, G.F., KOVACS, T.K. *et al.* Furfural Production Through Two Bioconversion Routes: Experimental Optimization and Process Simulation. **Waste Biomass Valor** **13**, 4013–4025, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01825-7>
- ⁹⁹ M. R. LOPES. **Leveduras fermentadoras de ceboliose isoladas de ecossistemas Brasileiros**, Universidade Federal de Minas Gerais, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/items/d0de968f-503b-4103-a0f2-db0843805556>
- ¹⁰⁰ FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5)
- ¹⁰¹ PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/15870>

- ¹⁰² GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T. do; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600026>
- ¹⁰³ CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A. e; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytuca**, São Paulo, n. 44, p. 48-54, jan. 2010.
- ¹⁰⁴ RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 150 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.97.2012.tde-27082013-105559>
- ¹⁰⁶ FONSECA, B. G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.97.2009.tde-26092012-152802>
- ¹⁰⁷ BONTURI, N.; CRUCELLO, A.; VIANA, A. J. C.; MIRANDA, E. A. Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain. **Process Biochemistry**, v. 57, p. 16–25, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.007>
- ¹⁰⁸ DIWAN, B.; PARKHEY, P.; GUPTA, P. From agro-industrial wastes to single cell oils: a step towards prospective biorefinery. **Folia Microbiologica**, v. 63, p. 547–568, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0602-7>
- ¹⁰⁹ LIU, Z.; FEIST, A.; DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I. Lipid and carotenoid production from wheat straw hydrolysates by different oleaginous yeasts. **Journal of Cleaner Production**, v. 249, art. 119308, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119308>
- ¹¹⁰ LOPES, H. J.; BONTURI, N.; KERKHOVEN, E. J.; MIRANDA, E. A.; LAHTVEE, P.-J. C/N ratio and carbon source-dependent lipid production profiling in *Rhodotorula toruloides*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 2639–2649, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10386-5>
- ¹¹¹ WIEBE, M. G.; KOIVURANTA, K.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L. Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5- and 6-carbon carbohydrates. **BMC Biotechnology**, v. 12, art. 26, 2012. Disponível em: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-12-26>

ANEXO

Anexo 1. Curva de peso seco para a *R. toruloides* UFMG-CM-Y2781, relacionando absorvância e concentração mássica.



Fonte. Próprio Autor.