

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 11/08/2025.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DE INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO SOBRE A
LEVEDURA *Pichia membranifaciens* LJ04 EM
HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO
DE ETANOL 2G**

Natália Novais Ribeiro

Tecnóloga em Biocombustíveis

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DE INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO SOBRE A
LEVEDURA *Pichia membranifaciens* LJ04 EM
HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO
DE ETANOL 2G**

Natália Novais Ribeiro

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

Coorientadora: Profa. Dra. Lidiane Aline de Freitas

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

2023

R484e Ribeiro, Natália Novais
Efeito de inibidores da fermentação sobre a levedura *Pichia membranifaciens* LJ04 em hidrolisados hemicelulósicos para a produção de etanol 2g / Natália Novais Ribeiro. -- Jaboticabal, 2023
116 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton
Coorientadora: Lidyane Aline de Freitas

1. Agrocombustíveis. 2. Etanol celulósico. 3. Furanos. 4. Ácidos orgânicos. 5. Fenóis. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITO DE INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO SOBRE A LEVEDURA *Pichia membranifaciens* LJ04 EM HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

AUTORA: NATÁLIA NOVAIS RIBEIRO

ORIENTADORA: MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

COORIENTADORA: LIDYANE ALINE DE FREITA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Pós-doutoranda LIDYANE ALINE DE FREITA (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente

LIDYANE ALINE DE FREITA
Data: 11/08/2023 18:30:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural / UFSCar - Araras/SP



Documento assinado digitalmente

SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI
Data: 11/08/2023 18:15:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. LEONARDO LUCAS MADALENO (Participação Virtual)
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP



Documento assinado digitalmente

LEONARDO LUCAS MADALENO
Data: 12/08/2023 09:02:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a SARITA CÂNDIDA RABELO (Participação Virtual)
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / FCA UNESP Botucatu



Documento assinado digitalmente

SARITA CANDIDA RABELO
Data: 11/08/2023 18:08:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. OSANIA EMERENCIANO FERREIRA (Participação Virtual)
Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) / Frutal/MG



Documento assinado digitalmente

OSANIA EMERENCIANO FERREIRA
Data: 13/08/2023 18:38:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 11 de agosto de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NATÁLIA NOVAIS RIBEIRO – Nasceu aos 24 de dezembro de 1993, no município de Sertãozinho, estado de São Paulo. Em fevereiro de 2013, ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis na Faculdade de Tecnologia, Fatec Nilo De Stéfani, Jaboticabal, recebendo o título de Tecnóloga em Biocombustíveis em agosto de 2016. Em março de 2017, ingressou no Mestrado Acadêmico no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, como bolsista Capes, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal-SP, sob a orientação da Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton. Durante esta época, realizou seu projeto de pesquisa intitulado “Caracterização das condições fermentativas da levedura *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração”, obtendo o título de Mestre em março de 2019. Neste mesmo período, ingressou no Doutorado Acadêmico, no programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, como bolsista Capes, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, logrando o título de doutora em Microbiologia Agropecuária em agosto de 2023.

Epígrafe

“Porque se às vezes dá preguiça de seguir
em frente, eu não me esqueço que é impossível
voltar pra trás”

- *Maria Paula Fraga*

A minha mãe pelo incentivo, fé, confiança e amor incondicional demonstrados.

A minha irmã pela amizade, carinho e companheirismo ao longo desta turbulenta etapa da minha vida.

A minha família e todos que de alguma forma tornaram este caminho mais fácil de ser percorrido.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada;

A minha mãe e irmã pelo carinho, incentivo, credibilidade e compreensão nas horas mais difíceis. Vocês fizeram esta vida valer cada vez mais a pena;

À Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, orientadora desta tese, pela confiança em meu trabalho, pela acolhida, por todo o conhecimento transferido, pela sabedoria, amizade e oportunidades oferecidas durante o tempo em que estive sobre seus cuidados;

Ao Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton pelos ensinamentos, generosidade e todo auxílio nos momentos de dificuldades;

À Dra. Lidiane Aline de Freitas, pela coorientação, disponibilidade, empenho, paciência, estímulo e dedicação;

A todos do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool, pelos momentos de aprendizado, colaboração e alegrias e tristezas compartilhadas.

Ao Programa de Microbiologia Agropecuária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) pela oportunidade de realização do curso e aprimoramento profissional;

Aos membros da banca examinadora pela participação e considerações;

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a concretização desse estudo;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
Capítulo 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Etanol 2G	4
2.2 Biomassa lignocelulósica	5
2.3 Pré-tratamento	5
2.4 Inibidores da fermentação.....	7
2.4.1 Derivados de furanos.....	8
2.4.2 Compostos fenólicos.....	9
2.4.3 Ácidos orgânicos.....	10
2.5 Destoxificação.....	10
2.6 Fermentação	11
2.7 Leveduras	11
2.8 <i>Pichia membranifaciens</i>	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
Capítulo 2 - TOLERÂNCIA DE <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04 A INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G	21
RESUMO	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	24

2.1	Microrganismo	24
2.2	Preparo do inóculo	25
2.3	Delineamento experimental	25
2.4	Preparo do hidrolisado hemicelulósico sintético	25
2.5	Processo fermentativo	26
2.6	Métodos analíticos e quantitativos	26
2.7	Análise cinética	27
2.8	Análise dos dados	29
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1	Efeito dos inibidores na cinética fermentativa	29
3.2	Análises microbiológicas	34
3.3	Produtos da fermentação alcoólica	36
4.	CONCLUSÕES	45
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
Capítulo 3 - PRODUÇÃO DE ETANOL 2G EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO SEM DESTOXIFICAÇÃO POR <i>Pichia membranifaciens</i>		54
RESUMO		54
1.	INTRODUÇÃO	55
2.	MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1	Microrganismo	58
2.2	Preparo do inóculo	58
2.3	Delineamento experimental	59
2.4	Concentração e destoxificação do licor hemicelulósico	60
2.5	Preparo do hidrolisado hemicelulósico sintético	60
2.6	Preparo e esterilização do mosto	60
2.7	Processo fermentativo	61

2.1	Métodos analíticos e quantitativos.....	61
2.8	Análises cinéticas	62
2.9	Análise dos dados	64
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1	Cinética fermentativa.....	64
3.2	Análises microbiológicas	66
3.3	Produtos da fermentação alcoólica	70
4.	CONCLUSÕES	73
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
APÊNDICES.....		80
Apêndice A – EFEITO DE FURFURAL, HIDROXIMETILFURFURAL, ÁCIDO FÊNICO E ÁCIDO LEVULÍNICO NA CINÉTICA FERMENTATIVA DE <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04		81
Apêndice B – EFEITOS DE DIFERENTES HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS NA CINÉTICA FERMENTATIVA DE <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04		94

EFEITO DE INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO SOBRE A LEVEDURA *Pichia membranifaciens* LJ04 EM HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

RESUMO - O uso de resíduos agroindustriais (folhas, caules, palhas, bagaços, sabugos e cascas) apresenta-se atualmente como uma opção promissora para o aumento do volume de etanol produzido no Brasil, sem que haja a necessidade do aumento das áreas cultiváveis do país. Para isto, é necessário que tais biomassas passem por processos químicos, físicos e/ou biológicos visando a despolimerização da rígida estrutura lignocelulósica que os constituem. Desta forma, após pré-tratamento dessas matérias-primas, ocorre a obtenção do hidrolisado hemicelulósico rico em pentoses e produtos da degradação dos açúcares (furfural, hidroximetilfurfural e ácidos orgânicos), conhecidos por inibir o metabolismo de leveduras. Neste caso, antes da fermentação recomenda-se destoxificar o hidrolisado para remoção total ou parcial desses compostos. Contudo, é um processo caro que eleva o preço de produção desse biocombustível. À vista disso, a utilização de microrganismos que apresentem tolerância a presença de inibidores da fermentação e capacidade para fermentar pentoses e hexoses, torna-se um dos principais gargalos tecnológicos atuais. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivos avaliar como a presença de diferentes doses de inibidores da fermentação (furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico) afetam o crescimento celular e fermentação alcoólica de *Pichia membranifaciens* LJ04 em hidrolisados hemicelulósicos sintéticos e comparar o desenvolvimento de processos fermentativos conduzidos em hidrolisado hemicelulósico sem destoxificação, obtido por pré-tratamento ácido de bagaço de cana cana-energia. As avaliações dos parâmetros microbiológicos da fermentação foram realizadas em Câmara de Neubauer e as concentrações de Glicerol, Etanol e Ácido acético determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O trabalho demonstrou a capacidade de *Pichia membranifaciens* LJ04 em tolerar a presença de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico presentes em hidrolisados hemicelulósicos, e sua aptidão para a produção de etanol de segunda geração sem a necessidade de destoxificação dos hidrolisados.

Palavras-chave: Agrocombustíveis, Etanol celulósico, Furanos, Ácidos orgânicos, Fenóis.

EFFECT OF FERMENTATION INHIBITORS ON YEAST *Pichia membranifaciens* LJ04 IN HEMICELLULOSIC HYDROLYZES FOR THE PRODUCTION OF 2G ETHANOL

ABSTRACT - The use of agro-industrial residues (leaves, stems, straw, bagasse, cobs and fruit peels) is currently a promising option for increasing the volume of ethanol produced in Brazil, without the need to increase the country's arable land. For this, it is necessary that such biomasses undergo chemical, physical and/or biological processes aiming at the depolymerization of the rigid lignocellulosic structure that constitute them. Thus, after pre-treatment of these raw materials, a hemicellulose hydrolyzate rich in pentoses and sugar degradation products (furfural, hydroxymethylfurfural and organic acids) is obtained, known to inhibit yeast metabolism. In this case, before fermentation, it is recommended to detoxify the hydrolyzate for total or partial removal of these compounds. However, it is an expensive process that raises the production price of this biofuel. In view of this, the use of microorganisms that are tolerant to the presence of fermentative inhibitors and capable of fermenting pentoses and hexoses, becomes one of the main current technological challenges. In this sense, the present work aimed to evaluate how the presence of different doses of fermentative inhibitors (furfural, hydroxymethylfurfural, fenic acid and levulinic acid) affect cell growth and alcoholic fermentation of *Pichia membranifaciens* LJ04 in synthetic hemicellulosic hydrolysates and to compare the development of fermentation processes conducted in hemicellulosic hydrolyzate without detoxification, obtained by acid pre-treatment of cane-energy sugarcane bagasse. The evaluations of the microbiological parameters of the fermentation were carried out in a Neubauer Chamber and the concentrations of Glycerol, Ethanol and Acetic Acid determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The work demonstrated the ability of *Pichia membranifaciens* LJ04 to tolerate the presence of furfural, hydroxymethylfurfural, fenic acid and levulinic acid present in hemicellulosic hydrolysates, and its ability to produce second-generation ethanol without the need for detoxification of the hydrolyzed.

Keywords: Agrofuels, Cellulosic ethanol, Furans, Organic acids, Phenols.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Efeitos de diferentes doses de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico na velocidade específica máxima de crescimento (μ_m), velocidade específica crescimento (μ_x), biomassa produzida e velocidade de consumo de glicose (Q_g) e xilose (Q_x) de <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25 g.L ⁻¹) e xilose (45 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , durante 24 h.	30
Tabela 2 - Efeitos de diferentes doses de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico no rendimento de biomassa e etanol de <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25 g.L ⁻¹) e xilose (45 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , durante 24 h.	33
Tabela 3 - Análise de variância (Teste F) e teste de médias (Tukey) para massa celular, viabilidade celular e viabilidade dos brotos de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 na presença de diferentes doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido fênico e Ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L ⁻¹) e xilose (45 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , durante 24 h.....	35
Tabela 4 - Análise de variância (Teste F) e teste de médias (Tukey) para teores de glicose, xilose, glicerol, etanol e ácido acético consumidos e/ou produzidos por <i>P. membranifaciens</i> LJ04 na presença de diferentes doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido fênico e Ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L ⁻¹) e xilose (45 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , durante 24 h.	39

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Efeitos de diferentes tipos de hidrolisados hemicelulósicos na velocidade específica máxima de crescimento (μ_m), velocidade específica de crescimento (μ_x), biomassa produzida e velocidade de consumo de glicose (Q_g) e xilose (Q_x) de <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L ⁻¹ , durante 72 h.	65
--	----

Tabela 2 - Efeitos de diferentes tipos de hidrolisados hemicelulósicos no rendimento de biomassa e etanol de <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L ⁻¹ , durante 72 h.	66
Tabela 3 - Análise de variância (Teste F) e teste de médias (Tukey) para massa celular, viabilidade celular e viabilidade dos brotos de <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L ⁻¹ , durante 72 h.	67
Tabela 4 - Análise de variância (Teste F) e teste de médias (Tukey) para teores de glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol consumidos e/ou produzidos por <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L ⁻¹ , durante 72 h.	70

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1** - *Pichia membranifaciens* LJ04 cultivada em meio YPXD (extrato de levedura, peptona, D-xilose, D-glicose e ágar). A) Placa inoculada pelo método de espalhamento (Spread-Plate). B) Placa inoculada pelo método de semeadura em estrias. Fonte: De autoria própria.24
- Figura 2** - Desdobramento de interações para viabilidade celular de *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo.37
- Figura 3** - Desdobramento de interações para viabilidade dos brotos de *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo.38
- Figura 4** - Desdobramento de interações para etanol produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo.41
- Figura 5** - Desdobramento de interações para ácido acético produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo.43

Figura 6 - Desdobramento de interações para glicerol produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L^{-1}) e xilose (45 g.L^{-1}), à 32°C , 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo.44

CAPÍTULO 3

Figura 1 - *Pichia membranifaciens* LJ04 cultivada em meio YPXD (extrato de levedura, peptona, D-xilose, D-glicose e ágar). Fonte: De autoria própria.58

Figura 2 – Crescimento de *Pichia membranifaciens* LJ04 em meio YPXD (extrato de levedura, peptona, D-xilose, D-glicose). Da esquerda para a direita: Inoculação da levedura em meio YPXD líquido; meio de crescimento centrifugado após 72h; massa de levedura recuperada e suspendida em solução salina (NaCl 0,85%). Fonte: Elaboração própria.59

Figura 3 - Hidrolisados hemicelulósicos após ajuste de pH. Da esquerda para direita: Hidrolisado sem destoxificação, hidrolisado destoxificado e hidrolisado sintético. Fonte: De autoria própria.61

Figura 4 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para massa celular produzida por *Pichia membranifaciens* LJ04 produzida na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C , 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de $2,8 \text{ g.L}^{-1}$, durante 72 h.68

Figura 5 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para viabilidade celular de *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C , 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de $2,8 \text{ g.L}^{-1}$, durante 72 h.69

Figura 6 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para viabilidade dos brotos de *Pichia membranifaciens* LJ04 produzida na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C , 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de $2,8 \text{ g.L}^{-1}$, durante 72 horas.69

Figura 7 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para etanol produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes substratos de

fermentação, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h.72

Figura 8 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para ácido acético produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h.72

Figura 9 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para glicerol produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h.73

Apêndice A

Figura 1A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético sem inibidores, contendo glicose (25,0 g.L⁻¹) e xilose (45,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.81

Figura 2A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (0,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.82

Figura 3A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (1,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.82

Figura 4A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (1,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.83

Figura 5A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (2,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.83

Figura 6A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e furfural (2,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	84
Figura 7A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e furfural (3,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	84
Figura 8A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e hidroximetilfurfural (0,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	85
Figura 9A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e hidroximetilfurfural (1,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	85
Figura 10A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e hidroximetilfurfural (1,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	86
Figura 11A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e hidroximetilfurfural (2,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	86
Figura 12A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e hidroximetilfurfural (2,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	87
Figura 13A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e hidroximetilfurfural (3,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	87

Figura 14A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido fênico (0,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.....	88
Figura 15A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido fênico (1,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.....	88
Figura 16A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido fênico (1,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.....	89
Figura 17A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido fênico (2,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.....	89
Figura 18A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido fênico (2,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.....	90
Figura 19A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido fênico (3,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.....	90
Figura 20A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido levulínico (0,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	91
Figura 21A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido levulínico (1,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	91

Figura 22A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido levulínico (1,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	92
Figura 23A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido levulínico (2,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	92
Figura 24A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido levulínico (2,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	93
Figura 25A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido levulínico (3,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	93

Apêndice B

Figura 1B - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em hidrolisado hemicelulósico sintético (sem inibidores), contendo glicose (26 g.L ⁻¹) e xilose (43 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 1,8 g.L ⁻¹ , pelo período de 72 h.	94
Figura 2B - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em hidrolisado hemicelulósico de cana-energia destoxificado, contendo glicose (15 g.L ⁻¹) e xilose (39 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 1,8 g.L ⁻¹ , pelo período de 72 h.	95
Figura 3B - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em hidrolisado hemicelulósico de cana-energia sem destoxificação, contendo glicose (16 g.L ⁻¹) e xilose (37 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 1,8 g.L ⁻¹ , pelo período de 72 h.	95

Capítulo 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Visando garantir a demanda de energia, diversificação da matriz energética e proteção do meio ambiente, nas últimas décadas houve grande incentivo para procura e desenvolvimento de fontes de energia renováveis (ZHENG e REHMANN, 2014; OSMANI e ZHANG, 2017; RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017). Dentre as alternativas energéticas propostas, os biocombustíveis destacam-se como melhor opção ecológica para a substituição do petróleo, pois são fontes de energia viáveis e baratas que garantem a diminuição da emissão dos gases causadores do efeito estufa (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017; RODIONOVA *et al.*, 2017; BRACMORT, 2020).

De acordo com Rastogi e Shrivastava (2017), o bioetanol é o biocombustível que lidera o mercado global de substitutos aos combustíveis fósseis. É amplamente utilizado em motores de explosão de automóveis, tornando-se essencial para o setor de transporte de diversos países (OSMANI e ZHANG, 2017; BRACMORT, 2020).

O bioetanol atualmente produzido em larga escala pertence a primeira geração de biocombustíveis, sendo recorrentemente denominado de etanol 1G (LOPES *et al.*, 2017). É um produto obtido a partir do processamento de material vegetal contendo açúcares ou amido abundantes, isto é, culturas ricas em carboidratos diretamente ou indiretamente fermentescíveis (CASTRO, 2013; RODIONOVA *et al.*, 2017).

Através da adoção de diversas estratégias de expansão da produção de álcool etílico utilizando cana-de-açúcar, o Brasil conseguiu se configurar no cenário mundial como segundo maior produtor de etanol nas últimas quatro décadas (SILVA, 2017). Apesar disto, projeta-se que as culturas atuais não serão suficientes para atender a futura demanda internacional, sendo necessário à realização de políticas de implementações de novas matérias-primas e tecnologias (LOPES *et al.*, 2017).

Neste contexto, a produção de etanol de segunda geração apresenta-se como opção viável e promissora para o aumento do volume produzido sem que haja a necessidade da expansão de terras cultiváveis (RODIONOVA *et al.*, 2017). É uma alternativa atraente para usinas e destilarias brasileiras pois é produzido através do processamento de material lignocelulósico, desta forma, sua matéria-prima encontra-

se disponível em abundância durante todo o ano graças ao bagaço obtido após a extração do caldo da cana-de-açúcar (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017).

A viabilidade do uso de biomassa vegetal para produção de etanol promoveu nos últimos anos a reativação e surgimento de novas pesquisas de variedades de cana-de-açúcar (MATSUOKA *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2016). A cana-energia foi desenvolvida através de diferentes cruzamentos de espécies ancestrais e híbridos comerciais de cana, em razão da necessidade de um biótipo mais robusto, potencialmente produtivo, com maior teor de fibra e vida útil no corte; características ideais para a produção de biocombustíveis de segunda geração (FERNANDES JÚNIOR, 2017).

Independentemente da matéria-prima utilizada, é extremamente importante que a biomassa passe por um ou mais tratamentos para que ocorra a quebra da estrutura complexa de celulose, hemicelulose e lignina que a compõe (BALAT, 2011; XU e WANG, 2017). Através da realização de processos químicos, físico-químicos, biológicos e/ou enzimáticos ocorre o desprendimento de açúcares simples (D-xilose, L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, entre outros) que podem ser efetivamente transformados em bioetanol com a ajuda de microrganismos (ZHENG *et al.*, 2013; TOMÁS-PEJÓ, BONANDER e OLSSON, 2014; MYAT e RYU, 2016; AZHAR *et al.*, 2017)

Já existem diversas metodologias capazes de realizar a quebra da estrutura cristalina de materiais vegetais (FERREIRA, 2015). Técnicas de pré-tratamento eficientes que aumentam a digestibilidade da celulose e hemicelulose, podem ser alcançadas através de tratamento ácido, alcalino, hidrólise enzimática e explosão a vapor (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017).

De acordo com relatos da literatura, a hemicelulose presente em biomassa lignocelulósica de resíduos agrícolas é mais propensa a despolimerizar sob calor ou condições ácidas, enquanto a celulose e lignina são mais resistentes à decomposição térmica, sendo, por este motivo, muitas vezes necessário a realização de um tratamento enzimático com a celulignina que se forma após o pré-tratamento (ZHENG *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2017; XU e WANG, 2017).

A realização da destoxificação do hidrolisado obtido após o pré-tratamento é benéfica e necessária, uma vez que produtos inibidores do processo fermentativo

(ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural) são produzidos durante o processo de despolimerização da hemicelulose (LI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015; XU e WANG, 2017; RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017). Entretanto a remoção de compostos tóxicos gerados durante o processo aumenta o custo do tratamento e, portanto, o preço de produção deste tipo de etanol se torna maior (ACHINAS e EUVERINK, 2016; RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017).

A escolha da linhagem do microrganismo que realizará o processo fermentativo é outro fator determinante para obtenção de um processo fermentativo eficiente (MOREIRA *et al.*, 2015). Alguns gêneros de microrganismos já demonstraram capacidade para fermentar pentoses e hexoses, tanto separadamente quanto simultaneamente (RASTOGI E SHRIVASTAVA, 2017). Segundo a literatura, existe um grande número de leveduras que realizam a metabolização de D-xilose, entretanto, destas somente cerca de 1% são capazes de fermentar xilose em etanol (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2007).

Pichia membranifaciens é uma levedura normalmente encontrada em materiais vegetais, frutas estragadas e bebidas fermentadas (KURTZMAN, 2011). Cepas desta espécie que metabolizam e fermentam açúcares de cinco e seis carbonos já foram descritas na literatura (HOLLUPI, 2015; RIBEIRO, 2019). Esta levedura já foi relatada como tolerante à ácido orgânicos, sendo encontradas linhagens que resistiram até 30 g.L⁻¹ de ácido acético em soluções de vinagre e 12 g.L⁻¹ em processo fermentativo de etanol de segunda geração (ŠTORNIK *et al.*, 2016; RIBEIRO, 2019).

A produção comercial de bioetanol de segunda geração a partir de material lignocelulósico ainda está em desenvolvimento, à vista disto, diversos desafios precisam ser resolvidos (XU *et al.*, 2015; XU e WANG, 2017). Dentre as diversas barreiras à serem transpostas, a necessidade de leveduras que realizem o processo fermentativo na presença de substâncias tóxicas se mostra importante, pois pode reduzir custos através da retirada da etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico.

Neste contexto, o estudo do comportamento de leveduras não-convencionais em diferentes doses de inibidores da fermentação e seu desempenho em hidrolisados hemicelulósicos com e sem destoxificação, mostra-se relevante para a comunidade científica. Desta forma, ao explorar todo o potencial de *P. membranifaciens*, pode-se

gerar novos conhecimentos e, conseqüentemente, melhorias nos rendimentos e diminuição de custos no processo produtivo de etanol 2G.

Sendo assim, a presente pesquisa foi dividida em três partes:

Capítulo 1: Revisão bibliográfica;

Capítulo 2: Avaliação do comportamento fisiológico e fermentativo de *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico (substâncias com forte potencial inibitório em fermentações) para a produção de etanol 2G.

Capítulo 3: Avaliação o desempenho fermentativo de *Pichia membranifaciens* LJ04 em mosto preparado com hidrolisado hemicelulósico, obtido por pré-tratamento ácido de bagaço de cana-energia, com e sem destoxificação.

4. CONCLUSÕES

O trabalho demonstrou que é possível a produção de etanol por *Pichia membranifaciens* LJ04 em hidrolisados hemicelulósicos sem destoxificação, sem que haja perdas significativas no rendimento do processo fermentativo de produção de etanol.

A presença de inibidores da fermentação no hidrolisado levou a um crescimento celular mais vagaroso, mas não afetou a velocidade específica de crescimento (μ_x), biomassa produzida, velocidade de consumo de glicose (Q_g) e xilose (Q_x).

Houve diminuição na velocidade de consumo de glicose e aumento na velocidade de xilose em hidrolisado destoxificado e sem destoxificação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. R.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica, ciência & tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005.

ASTUTI, R. I.; NURHAYATI, N.; ALIFIYANTI, S.; SUNARTI, T. C.; MERYANDINI, A. Exogenous L-proline increases stress tolerance of yeast *Pichia kudriavzevii* against inhibitors in lignocellulose hydrolysates and enhances its ethanol production. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2018. p. 012052.

BARBOSA, J.C.; MALDONADO JUNIOR, W. **Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos - AgroEstat**, versão 1.1.0.711, 2015.

BRONZATO, G. R. F. **Avaliação do aproveitamento da casca do coco verde para a produção de etanol 2G**. 2021. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 108 p. 2021.

BRONZATO, G. R. F.; REIS, V. A. C. A.; BORRO, J. A.; LEÃO, A. L.; CESARINO, I. Second generation ethanol made from coir husk under the biomass Cascade approach. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 693, n. 1, p. 107–114, 2019. DOI: 10.1080/15421406.2020.1723890

BRONZATO, G. R. F.; ZIEGLER, S. M.; SILVA, R. C.; CESARINO, I.; LEÃO, A. L. Characterization of the pre-treated biomass of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth)

for the second generation ethanol production. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 655, n. 1, 2017. DOI: 10.1080/15421406.2017.1360696

BRONZATO, G. R. F.; ZIEGLER, S. M.; SILVA, R. C.; CESARINO, I.; LEÃO, A. L. Water hyacinth second-generation ethanol production: a mitigation alternative for an environmental problem. **Journal of Natural Fibers**, 2018. DOI: 10.1080/15440478.2018.1458000

CANDIDO, R. G. *et al.* **Sugarcane straw as feedstock for 2G ethanol: Evaluation of pretreatments and enzymatic hydrolysis**. Elsevier, v. 142, 2019.

CARVALHO, P.; COSTA, C. E.; BAPTISTA, S. I. L.; DOMINGUES, L. CARVALHO. Yeast cell factories for sustainable whey-to-ethanol valorisation towards a circular economy. **Biofuel Research Journal**, v. 8, n.4, p. 1529-1549, 2021.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; CODATO, C. B.; MARTINI, C.; BASTOS, R. G.; TAUKTORNISIELO, S. M. Yeast for pentose fermentation: isolation, screening, performance, manipulation, and prospects. **Advances of basic science for second generation bioethanol from sugarcane**, p. 133-157, 2017.

CHANDEL, A. K.; GARLAPATI, V. K.; SINGH, A. K.; ANTUNES, F. A. F.; SILVA, S. S. The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. **Bioresource technology**, v. 264, p. 370-381, 2018.

COLOMBI, B. L.; ZANONI, P. R. S.; TAVARES, L. B. B. Effect of phenolic compounds on bioconversion of glucose to ethanol by yeast *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 7, p. 1444-1450, 2018.

DEVI, A.; SINGH, A.; BAJAR, S.; PANT, D.; DIN, Z. U. Ethanol from lignocellulosic biomass: An in-depth analysis of pre-treatment methods, fermentation approaches and detoxification processes. **Journal of Environmental Chemical Engineering, Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 105798, 2021.

DONINI, C. A.; SILVA, M. K. L.; BRONZATO, G. R. LEÃO, A. L. CESARINO, I. Evaluation of a biosensor based on reduced graphene oxide and glucose oxidase enzyme on the monitoring of second-generation ethanol production. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, n. 8, 2020. DOI: 10.1007/s10008-019-04471-7

FREITA, C. M. **Emprego da *Moringa oleífera* Lam para destoxificação do licor hemicelulósico de sorgo e cana-energia para produção de etanol de segunda geração.** 2020. 120 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2020.

GOVINDASWAMY, S.; VANE, L. M. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 677–685, 2007.

HAHN-HAGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74: 937-953, 2007.

HAO, X. C.; YANG, X. S.; WAN, P.; TIAN, S. Comparative proteomic analysis of a new adaptive *Pichia Stipitis* strain to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2013.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 489–496, 2016.

HOLLUPI, N. T. **Isolamento, caracterização e identificação de leveduras do ecossistema de produção do sorgo sacarino.** 2015. 58 f. Monografia (Graduação) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2015.

JÖNSSON, L. J., ALRIKSSON, B., NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-10, 2013.

KORDALA, N.; WALTER, M.; BRZOZOWSKI, B.; LEWANDOWSKA, M. 2G-biofuel ethanol: an overview of crucial operations, advances and limitations. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02861-y>

KURTZMAN, C. P. *Pichia* E. G. Hansen emend. Kurtzman. In: Kurtzman, C. P.; FELL, J. W. (Eds.). **The Yeasts: A Taxonomic Study**, 4. ed., v. 1. Elsevier Science, 1998.

LAMICHHANE, G.; ACHARYA, A.; POUDEL, D. K.; ARYAL, B.; GYAWALI, N.; NIRLAULA, P.; PARAJULI, N. Recent advances in bioethanol production from

lignocellulosic biomass. **International Journal of Green Energy**, v. 18, n. 7, p. 731-744, 2021.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

LI, X.; CHEN, Y.; NIELSEN, J. Harnessing xylose pathways for biofuels production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 57 p. 56-65, 2019. 10.1016/j.copbio.2019.01.006

MARTON, J. M. **Avaliação dos diferentes carvões ativados e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para a obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2002.

MILESSI, T. S.; SILVA, C. R.; MORAES, G. S.; AQUINO, P. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L.; ZANGIROLAMI, T. C. Continuous 2G ethanol production from xylose in a fixed-bed reactor by native *Saccharomyces cerevisiae* strain through simultaneous isomerization and fermentation. **Cellulose**, v. 27, p. 4429-4442, 2020.

MUTTON, M. J. R.; FERRARI, F. C.; FREITA, L. A.; FREITA, C. M.; ANDRIETTA, M. D. G. S.; ANDRIETTA, S. R. Interaction between the production of ethanol and glycerol in fed-batch bioreactors. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 389-394, 2019.

NAKANISHI, S. C.; SOARES, L. B.; BIAZI, L. E.. NASCIMENTO, V. M.; COSTA, A. C.; ROCHA, G. J. M.; IENCZAK, J. L. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2211-2221, 2017.

NDUBUISI, I. A.; AMADI, C. O.; NWAGU, T. N., MURATA; Y., & OGBONNA; J. C. Non-conventional yeast strains: unexploited resources for effective commercialization of second generation bioethanol. **Biotechnology Advances**, v. 63, p. 108100, 2023.

NDUBUISI, I. A.; QIN, Q.; LIAO, G.; WANG, B.; MONEKE, A. N.; OGBONNA, J. C.; FANG, W. Effects of various inhibitory substances and immobilization on ethanol production efficiency of a thermotolerant *Pichia kudriavzevii*. **Biotechnology for biofuels**, v. 13, p. 1-12, 2020.

PAVANI, C. D.; ROVIERO, J. P.; FREITA, L. A.; COSTA, G. H. G.; MUTTON, M. J. R. Efeito da concentração de N, P, Mg, Mn e Zn sobre a fisiologia da levedura em fermentação. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB**, v. 5, 2013.

PEREZ, C. L.; PEREIRA, L. P. R. C.; MILESSI, T. S.; SANDRI, J. P.; DEMEKE, M.; FOULQUIE-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M.; ZANGIROLAMI, T. C. Towards a practical industrial 2G ethanol production process based on immobilized recombinant *S. cerevisiae*: Medium and strain selection for robust integrated fixed-bed reactor operation. **Renewable Energy**, v. 185, p. 363-375, 2022.

RAMYA, P.; GOMATHI, V.; DEVI, R. P.; BALACHANDAR, D. *Pichia kudriavzevii*—a potential soil yeast candidate for improving soil physical, chemical and biological properties. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 7, p. 4619-4628, 2021.

RIBEIRO, N. N. **Caracterização das condições fermentativas da levedura *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração**. 2019. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista, 2019.

RIBEIRO, N. N.; FREITA, L. A.; TRALLI, L. F.; SILVA, A. F.; FREITA, C. M.; MENDES, F. Q.; TEIXEIRA, V.; SILVA JUNIOR, C. N.; MUTTON, M. J. R. Otimização das condições fermentativas de *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p. 720–728, 2019.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Current state-of-the-art in ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Microbiological Research**, v. 240, p. 126534, 2020.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174, 2018.

SANDRI, J. P.; MILESSI, T. S.; ZANGIROLAMI, T. C.; MUSSATTO, S. I. Screening of yeast co-culture using crude hydrolysate for co-fermentation of pentose and hexose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 17, n. 6, p. 1639-1653, 2023.

SEWSYNKER-SUKAI, Y.; NAOM-DAVID, A.; GUEGUIM-KANA, E. B. Recent developments in the application of kraft pulping alkaline chemicals for lignocellulosic pretreatment: Potential beneficiation of green liquor dregs waste. **Bioresource Technology**, v. 306, p. 123225, 2020. 10.1016/j.biortech.2020.123225

SHARMA, B.; LARROCHE, C.; DUSSAP, C. G. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. **Bioresource technology**, v. 313, p. 123630, 2020.

SILVA, A. F. **Avaliação do potencial de leveduras fermentadoras de pentoses na produção de etanol 2G, a partir de bagaço de sorgo**. 2019. 90 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2019.

SILVA, C. N. S.; BRONZATO, G. R. F.; CESARINO, I.; LEÃO, A. L. Second-generation ethanol from pineapple leaf fibers. **Journal of Natural Fibers**, v. 17, n. 1, p. 113–121, 2020. DOI: 10.1080/15440478.2018.1469453

SILVA, J. A.; SILVA, F. L. H. D.; ALVES, R. R. D. N.; SANTANA, D. P. D. Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e °Brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 29, p. 695-698, 2006.

SOARES, L. B.; BONAN, C. I. D. G.; BIAZI, L. E.; DIONÍSIO, S. R.; BONATELLI, M. L.; ANDRADE, A. L. D.; RENZANO, E. C.; COSTA, A. C.; IENCZAK, J. L. Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-saccharomyces species. **Biomass and Bioenergy**, v. 137, p. 105549, 2020.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects. **Biofuels**, p. 287-311, 2011. doi:10.1016/b978-0-12-385099-7.00012-7 (2011).

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. John Wiley & Sons, 1998.

WANG, S.; CHENG, G.; JOSHUA, C.; ZIJUN, H.; XINXIAO, S.; RUIMIN, L.; QIPENG, Y. Furfural tolerance and detoxification mechanism in *Candida tropicalis*. **Biotechnol Biofuels**, v. 9, p. 250, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0668-x>

XU, Y.; WANG, D. Integrating starchy substrate into cellulosic ethanol production to boost ethanol titers and yields. **Applied Energy**, v. 195, p. 196-203, 2017.

ZHANG, Y.; HOU, T.; LI, B.; LIU, C.; MU, X.; WANG, H. Acetone-butanol-ethanol production from corn stover pretreated by alkaline twin-screw extrusion pretreatment. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, p. 913-921, 2014.