

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**TOLERÂNCIA DE *Rhotodotula mucilaginosa* L18 A INIBIDORES DA
FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

Mateus Felipe Grigoletto

Jaboticabal - SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

TOLERÂNCIA DE *Rhotodotula mucilaginosa* L18 A INIBIDORES DA
FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

MATEUS FELIPE GRIGOLETTO

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

Coorientadora: Kátia Gabriela de Natale

Trabalho apresentado à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal – SP

2º Semestre/2023

G857t	Grigoletto, Mateus Felipe TOLERÂNCIA DE <i>Rhotodotula mucilaginosa</i> L18 A INIBIDORES DA FERMENTATAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G / Mateus Felipe Grigoletto. -- Jaboticabal, 2023 49 p. : tabs. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Márcia J. R.
-------	--

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.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO: Biotecnologia Agropecuária e Ambiental

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: Tolerância de *Rhodotorula mucilaginosa* L18 a inibidores da fermentação para produção de etanol 2G

ACADÊMICO: Mateus Felipe Grigoletto

CURSO: Ciências Biológicas

ORIENTADORA: Profa Dra Márcia Justino Rossini Mutton

COORIENTADORA: Bch. Kátia Gabriela de Natale

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

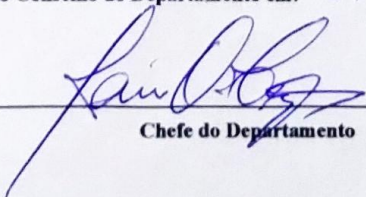
BANCA EXAMINADORA:

Presidente Bch. Kátia Gabriela de Natale
Membro Dra Natália Novais Ribeiro
Membro Bch. Lucas Antoszczen Pironti

Kátia Natale
Natália Novais Ribeiro
Lucas A. Pironti

Jaboticabal 24 / 11 / 2023

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 24 / 11 / 2023



Chefe do Departamento

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, Maria de Fátima e Carlos César, que sempre me amaram e apoiaram; esta conquista seria impossível sem eles e minha família.

À Professora Doutora Márcia J. R. Mutton, que me ofereceu de braços abertos a oportunidade de conhecer o Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool, onde me deu a orientação necessária na área acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório dos quais tenho orgulho de ter tido a oportunidade de conhecer, à minha Coorientadora e grande amiga Kátia que para sempre serei grato por todo apoio; à Natália que sempre teve muita disposição para nos ensinar e a todos os demais membros e ex-membros do laboratório TAA que tive o prazer de conhecer, meu sincero obrigado.

Ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) e ao Professor Dr. Michel Brienzo pela parceria e apoio fornecido com as análises cromatográficas.

À UNESP/FCAV e ao Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental, por fornecer toda a infraestrutura para o meu desenvolvimento na pesquisa científica e profissional.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho de pesquisa.

A todos os meus amigos, à Renata, que me inspirou desde o princípio, Kauane, Bruno, João, Gabriel, Felipe e Júlia, além de muitos outros, mesmo que os caminhos da vida sejam diferentes, sempre estarão em meus pensamentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Objetivos gerais	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. Revisão de literatura	4
3.1. Etanol de Segunda Geração	4
3.2. Biomassa lignocelulósica	5
3.3 Pré-tratamento	6
3.4. Inibidores da fermentação.....	7
3.4.1. Furano-aldeídos.....	7
3.4.2. Compostos fenólicos	8
3.4.3. Ácido levulínico	8
3.5 Destoxificação.....	9
3.6. Fermentação	9
3.7. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	10
4. Material e métodos.....	12
4.1. Microrganismo e crescimento de massa	12
4.2. Delineamento experimental.....	13
4.3. Preparo e esterilização do mosto	13
4.4. Processo fermentativo	13
4.5. Cinética de crescimento	13
4.5.1. Métodos analíticos.....	14
4.5.2. Análise cinética.....	14

4.6. Análises cromatográficas	14
4.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	15
4.6.2 Cromatografia gasosa	15
4.7. Análise estatística	15
5. Resultados e discussão.....	16
5.1. Cinética de crescimento	16
5.2. Produção de etanol	27
6. Conclusão	33
7. Referências	34

TOLERÂNCIA DE *Rhodotula mucilaginosa* L18 A INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

RESUMO

A biomassa lignocelulósica é a matéria-prima empregada na produção de Etanol de Segunda Geração (2G). Sendo composta por celulose, hemicelulose e lignina que precisam ser inicialmente despolimerizadas. Neste sentido, a fase de pré-tratamento é essencial ao processo. Após esta etapa, obtêm-se um hidrolisado hemicelulósico rico em pentoses e hexoses. Entretanto, podem ser formadas diversas substâncias que inibem reações metabólicas de crescimento e produção de etanol. Apesar da possibilidade de destoxificação deste hidrolisado, os métodos atuais elevam substancialmente os custos de produção deste biocombustível. Dessa forma, entre as alternativas que podem ser exploradas, destaca-se o uso de microrganismos tolerantes aos inibidores da fermentação. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a cinética de crescimento e o rendimento de *Rhodotorula mucilaginosa* L18 na presença de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido Fênico e Ácido Levulínico em mosto sintético e analisar como a presença de inibidores da fermentação afetam a fisiologia, crescimento e fermentação alcoólica da levedura para produção de etanol 2G. O delineamento experimental foi realizado em parcelas sub-subdivididas, avaliando-se as doses de 0,1 g.L⁻¹, 0,5 g.L⁻¹, 1,0 g.L⁻¹, 1,5 g.L⁻¹ e 2,0 g.L⁻¹ para cada inibidor separadamente. Foram feitas análises microbiológicas para determinação da cinética de crescimento da levedura, quantificação de glicose e xilose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e etanol por Cromatografia Gasosa. A levedura apresentou crescimento celular igual ou superior ao controle negativo em todas as doses avaliadas. O ácido levulínico foi o inibidor que acarretou a menor produção de biomassa. Não houve diferença significativa na produção de etanol entre os tratamentos com diferentes inibidores, sendo a maior quantidade obtida nas primeiras seis horas. Apesar do baixo rendimento alcoólico, a cepa L18 mostrou-se capaz de sobreviver e se multiplicar mesmo na presença dos inibidores de fermentação e de metabolizar glicose e xilose.

Palavras-chave: Biocombustíveis, Biomassa, Furanos, Ácidos orgânicos, Ácido fenólico.

TOLERANCE OF *Rhodotorula mucilaginosa* L18 TO FERMENTATION INHIBITORS FOR 2G ETHANOL PRODUCTION

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is the raw material employed in the production of Second Generation Ethanol (2G). It is composed of cellulose, hemicellulose, and lignin, which need to be initially depolymerized. In this context, the pre-treatment phase is essential to the process. After this stage, a hemicellulosic hydrolysate rich in pentoses and hexoses is obtained. However, various substances that inhibit metabolic reactions for growth and ethanol production can be formed. Despite the possibility of detoxifying this hydrolysate, current methods substantially increase the production costs of this biofuel. Thus, among the explored alternatives, the use of microorganisms tolerant to fermentation inhibitors stands out. The present research aimed to evaluate the growth kinetics and yield of *Rhodotorula mucilaginosa* L18 in the presence of Furfural, Hydroxymethylfurfural, Phenolic Acid, and Levulinic Acid in synthetic must. The study also analyzed how the presence of fermentation inhibitors affects the physiology, growth, and alcoholic fermentation of yeast for 2G ethanol production. The experimental design was carried out in sub-subdivided plots, evaluating doses of 0.1 g.L⁻¹, 0.5 g.L⁻¹, 1.0 g.L⁻¹, 1.5 g.L⁻¹, and 2.0 g.L⁻¹ for each inhibitor separately. Microbiological analyses were performed to determine the yeast growth kinetics, quantify glucose and xylose by High-Performance Liquid Chromatography, and ethanol by Gas Chromatography. The yeast showed cellular growth equal to or higher than the negative control at all evaluated doses. Levulinic acid was the inhibitor that resulted in the lowest biomass production. There was no significant difference in ethanol production between treatments with different inhibitors, with the highest amount obtained in the first six hours. Despite the low alcoholic yield, the L18 strain demonstrated the ability to survive and multiply even in the presence of fermentation inhibitors, metabolizing glucose and xylose.

Keywords: Biofuels, Biomass, Furans, Organic Acids, Phenolic Acid.

1. Introdução

A crescente preocupação ambiental aliada à necessidade de aumentar a produção de combustíveis tem motivado a busca por fontes de energia renováveis, visando substituir o uso de produtos de origem fóssil. Neste sentido, o Etanol de Segunda Geração (2G) mostra-se uma alternativa para elevar o volume de biocombustíveis produzidos no Brasil e no mundo, assim como diminuir os impactos ao meio ambiente (XU e WANG, 2017).

O etanol 2G é considerado uma tecnologia sustentável, uma vez que é gerado a partir do material lignocelulósico. Devido a notável produção de etanol pelas usinas e destilarias brasileiras, o aproveitamento da biomassa lignocelulósica é uma opção promissora, uma vez que o processamento da cana-de-açúcar gera resíduos abundantes e de baixo custo (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006; XU e WANG, 2017).

Além do bagaço de cana, outras matérias-primas também podem ser empregadas para a produção de biocombustíveis de segunda geração, tais como palha e sabugo de milho, palha de arroz e trigo, bagaço de sorgo sacarino, entre outras. Dessa forma, é possível aumentar o volume de combustíveis sem a necessidade de expansão da área de plantio (PACHECO, 2011).

Contudo, independentemente da matéria-prima utilizada, é necessário que seja feito o pré-tratamento da biomassa, visando romper a complexa estrutura da lignocelulose e, assim, liberar os açúcares fermentescíveis, os quais compreendem as pentoses, especialmente xilose, e as hexoses como a glicose (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017).

Entretanto, durante esta etapa pode haver a formação de substâncias que inibem o processo fermentativo, uma vez que interferem na atividade microbiana. Dessa forma, o rendimento e a produtividade tornam-se reduzidos, devido ao comprometimento da metabolização dos açúcares fermentescíveis pelos microrganismos (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

Os inibidores de fermentação compreendem três principais categorias: os ácidos orgânicos fracos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico), os derivados de furanos (furfural e hidroximetilfurfural [HMF]) e os compostos fenólicos. Estas substâncias são capazes de inibir o crescimento dos microrganismos, provocar o rompimento de moléculas de DNA, interromper a

síntese de RNA e proteínas e afetar a integridade da membrana celular, prejudicando sua função de atuar como barreira seletiva e matriz enzimática (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006).

Em razão disso, recomenda-se a realização da destoxificação do hidrolisado hemicelulósico. Porém, esta é uma etapa que encarece a produção deste biocombustível devido ao consumo de água, energia e produtos químicos, além de perdas de açúcares e formação de resíduos sólidos que requerem separação e destinação adequadas (XU e WANG, 2017).

Deste modo, o estudo de leveduras não-convencionais que sejam capazes de metabolizar diferentes tipos de açúcares, bem como tolerar a presença de inibidores é de extrema importância para auxiliar na consolidação da tecnologia de segunda geração, de forma a reduzir os custos de produção e garantir um rendimento satisfatório (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b; NANDAL; SHARMA; ARORA, 2020).

Estes microrganismos são caracterizados por sua tolerância a situações de estresse múltiplo, como temperaturas elevadas, baixo pH, altas concentrações de sais e presença de inibidores de fermentação. Assim, as leveduras não-convencionais exibem vantagens metabólicas e fisiológicas que estimulam sua aplicação em processos biotecnológicos (NAVARRATE e MARTÍNEZ, 2020).

A espécie *Rhodotorula mucilaginosa* tem se mostrado um microrganismo de interesse para diversos setores, incluindo indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, entre outras. Este potencial industrial está relacionado ao fato de ser uma produtora natural de carotenóides, bem como de lipídeos e enzimas (BONADIO; FREITA; MUTTON, 2018; GUALBERTO *et al.*, 2022).

Além da produção de pigmentos, *R. mucilaginosa* também é capaz de assimilar substratos mistos contendo glicose e xilose (JAIBOON *et al.*, 2016). Contudo, o emprego deste microrganismo para a produção de etanol de segunda geração ainda é pouco explorado, em que os relatos na literatura são escassos, especialmente acerca da resistência desta levedura aos inibidores da fermentação.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a cinética de crescimento celular, o consumo de substrato e a produção de etanol por *Rhodotorula mucilaginosa* L18 na presença de inibidores de fermentação em mosto sintético.

2.2 Objetivos específicos

Analisar como a presença de inibidores da fermentação afetam a fisiologia, crescimento e fermentação alcoólica da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L18 para produção de etanol 2G.

3. Revisão de literatura

3.1. Etanol de Segunda Geração

Com o objetivo de atender a necessidade energética crescente, diminuir a utilização de combustíveis fósseis e reduzir as emissões de carbono atmosférico, fontes alternativas de energia têm ganhado cada vez mais espaço no cenário mundial de combustíveis (CARPIO e DE SOUZA, 2017; CHANDEL *et al.*, 2019; DEVI *et al.*, 2021).

O etanol de origem vegetal é utilizado como combustível em motores flex ou como complemento para a gasolina para que se atinja a octanagem adequada (RAJ *et al.*, 2022). Em razão disso, a produção de bioetanol registrou grande aumento nos últimos anos, tendo o Brasil como um dos principais produtores (SHARMA, LARROCHE e DUSSAP, 2020).

A cana-de-açúcar é a principal matéria-prima utilizada em território nacional. Entretanto, visando sustentabilidade e abrangência de mercado, para que seja possível responder a demanda por biocombustíveis deve-se aumentar o aproveitamento de suas matéria-primas. Neste sentido, a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos tem se destacado (SARKAR *et al.*, 2012; SHARMA; LARROCHE; DUSSAP, 2020).

O bagaço da cana-de-açúcar representa, aproximadamente, um quarto do peso total da matéria-prima (SCHNEIDER *et al.*, 2012; CARPIO e DE SOUZA, 2017), sendo largamente utilizado na cogeração de energia a partir de sua queima em caldeiras. Porém, parte desta biomassa acaba por não ser utilizada, podendo ser empregada na produção de biocombustíveis de segunda geração (STANMORE, 2010).

Além da palha e do bagaço de cana-de-açúcar derivados da indústria sucroalcooleira, a biomassa lignocelulósica é obtida de diversas fontes, como bagaço de sorgo sacarino, palha residual das culturas de trigo, arroz e milho, resíduos florestais, como cavacos de madeira, entre outros (MENEGOL *et al.*, 2016; CARPIO e DE SOUZA, 2017; RAJ *et al.*, 2022).

Ao proporcionar um destino adequado aos resíduos agroindustriais, o etanol de segunda geração contribui para a diminuição de gases de efeito estufa, mostrando-se uma tecnologia limpa. Assim, visando a complementação da

produção de etanol e reaproveitamento de biomassa, empresas como a Raízen desenvolveram protótipos de plantas dedicadas ao etanol 2G e que também se encontram integradas à produção de primeira geração, com fins de melhoria de logística e aproveitamento tecnológico (ZAMBERLAN, 2022).

3.2. Biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos são uma fonte potencial de geração de energia, tendo em sua composição especialmente lignina, celulose e hemicelulose, em que os açúcares a serem utilizados para produção de etanol são derivados da degradação dos dois últimos componentes (CANILHA *et al.*, 2012).

Os compostos mais presentes na parede vegetal das plantas são polissacarídeos estruturais formados por longas cadeias interligadas por ligações iônicas ou covalentes, criando uma estrutura rígida e resistente, destacando-se a celulose e a hemicelulose (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012).

A celulose é o polissacarídeo mais abundante da estrutura lignocelulósica, sendo constituída por moléculas de D-glicose unidas por ligações covalentes do tipo β -1,4. As cadeias desta molécula são contínuas e não ramificadas, em que as ligações que as unem são responsáveis por conferir rigidez mecânica e resistência a solubilização (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012; ALVES, 2018).

As moléculas de celulose interagem entre si paralelamente a partir de pontes de hidrogênio, formando fibrilas que se unem à hemicelulose e à lignina. As fibrilas apresentam regiões de conformação cristalina que oferecem alta resistência a alterações em sua conformação e absorção de solventes. Assim, ao se ligar a lignina, forma-se uma estrutura pouco susceptível a quebra das longas cadeias em monossacarídeos (ALVES, 2018).

Conforme descrito por Junqueira e Carneiro (2012), a hemicelulose possui cadeias heterogêneas constituídas por pentoses (principalmente xilose) e hexoses, formando ramificações de cadeias curtas. A interação física da hemicelulose nas paredes vegetais confere maior elasticidade e mobilidade às fibras. Devido ao caráter amorfo desta molécula, a hemicelulose é mais susceptível a hidrólise ácida (ALVES, 2018).

A lignina, por sua vez, é um polímero fenólico complexo e hidrofóbico, o qual varia na quantidade presente na parede celular de acordo com a planta e seu nível

de crescimento, oferecendo resistência e proteção às células vegetais (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012). Na matéria vegetal, a lignina está entrelaçada à celulose e à hemicelulose por diversas ligações, exibindo função estrutural ao manter estas moléculas unidas (ALVES, 2018), de modo a conferir resistência às mesmas. Contudo, a lignina não é intencionada para a produção de biocombustíveis, mas pode ser reaproveitada para a fabricação de bioplásticos, vanilina, biogás, entre outros produtos de valor agregado (SIVAGURUNATHAN *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2019).

Contudo, para a liberação dos açúcares fermentescíveis, a biomassa deve passar pela etapa de pré-tratamento, visando romper a estrutura lignocelulósica para que o material siga para os processos de hidrólise enzimática, fermentação e destilação (CANILHA *et al.*, 2012).

3.3 Pré-tratamento

Dentre as etapas mais importantes para o processamento da biomassa lignocelulósica está o pré-tratamento. Este processo é necessário para transpor diversos fatores que impedem o acesso das enzimas aos polissacarídeos.

Assim, o pré-tratamento visa modificar a estrutura cristalina da celulose, aumentar a área superficial de contato, romper a interação da lignina com a celulose e a hemicelulose, solubilizar a lignina, aumentar a eficiência das reações enzimáticas, recuperar o máximo dos açúcares disponíveis e viabilizar o processo economicamente (ALVIRA *et al.*, 2010; CANILHA *et al.*, 2012).

As metodologias de pré-tratamento dividem-se em quatro categorias principais: física, química, biológica e físico-químicas. Destes, o pré-tratamento químico é o mais utilizado, especialmente a utilização de ácidos (sulfúrico, clorídrico, nítrico ou fosfórico). Este método garante maiores rendimentos na obtenção de açúcares (CANILHA *et al.*, 2012; SARKAR *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2013).

Durante a hidrólise ácida, são adicionados ácidos minerais ao meio da reação (BRIENZO, 2010), sendo um dos processos mais comumente utilizados, principalmente a partir da diluição do ácido sulfúrico no meio para a quebra da hemicelulose (ALVES, 2018).

Dessa forma, com a hidrólise da celulose origina-se a glicose, enquanto a partir da hemicelulose hidrolisada obtém-se pentoses e hexoses (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996; SARKAR *et al.*, 2012).

No entanto, os processos de pré-tratamento geram compostos que são capazes de inibir o processo fermentativo devido há efeitos negativos que trazem para as células microbianas. Estas substâncias são geradas a partir de diferentes componentes da biomassa lignocelulósica, causando efeitos nocivos à fisiologia dos microrganismos (WANG; SUN; YUAN, 2018).

Em vista disso, com o objetivo de remover ou reduzir a concentração de inibidores de fermentação, recomenda-se a realização do processo de destoxificação, em que a necessidade e o nível da destoxificação do material estão diretamente relacionados a sensibilidade do microrganismo aos compostos (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

3.4. Inibidores da fermentação

Os inibidores de fermentação são produtos indesejáveis originados a partir da degradação dos açúcares e de outros compostos durante o pré-tratamento, estando classificados em três principais categorias: derivados de furano ou furano-aldeídos, ácidos fracos de cadeia curta e compostos fenólicos (RABELO, 2010).

Estas substâncias agem nos mecanismos fisiológicos das células, inibindo o crescimento celular, provocando o rompimento de DNA e a interrupção da síntese de RNA e proteínas e alterando a osmolaridade, uma vez que prejudica a integridade da membrana celular. Em razão disso, a eficiência fermentativa é reduzida, resultando na menor produção de etanol (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

3.4.1. Furano-aldeídos

Os furano-aldeídos ou derivados de furanos mais encontrados em hidrolisados hemicelulósicos são o furfural, o qual origina-se da desidratação de açúcares de cinco carbonos (pentoses) e o hidroximetilfurfural (HMF), formado a partir da desidratação de hexoses (LIU *et al.*, 2004; MAMMAN *et al.*, 2008).

Estes inibidores são abundantes e considerados os mais potentes do processo fermentativo, diminuindo a produção de etanol e o crescimento das leveduras, podendo agir em sinergia para tais efeitos (LIU *et al.*, 2004; VAJZOVIC *et al.*, 2012; MUÑOZ-PÁEZ *et al.*, 2019).

Um estudo realizado por Allen *et al.* (2010), concluiu que o furfural induz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) na célula, causando danos estruturais internos, atingindo membranas mitocondriais, citoesqueleto, vacúolos e núcleo, além de inibir a atividade de enzimas relacionadas a produção de etanol (MUÑOZ-PÁEZ *et al.*, 2019).

3.4.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão presentes na estrutura das plantas e são liberados a partir da degradação da lignina. Estes inibidores podem agir como supressores da celulase e da hemicelulase, causando a diminuição da eficiência da hidrólise enzimática (MICHELIN *et al.*, 2016).

Nas leveduras, estas substâncias podem prolongar a fase de latência, diminuir a produção de etanol e danificar a estrutura celular ao penetrar a membrana plasmática, provocando a alteração do equilíbrio osmótico (WANG; SUN; YUAN, 2018).

Além disso, compostos fenólicos de baixo peso molecular adentram facilmente na célula e, de maneira similar ao furfural, aumentam a quantidade de EROs que danificam sua estrutura interna (WANG; SUN; YUAN, 2018).

3.4.3. Ácido levulínico

A degradação de alguns inibidores de fermentação pode levar à formação de ácidos fracos, como é o caso do ácido levulínico, o qual é gerado a partir da hidrólise do hidroximetilfurfural, especialmente quando o método de pré-tratamento utiliza ácidos (WANG; SUN; YUAN, 2018).

O ácido levulínico, quando adentra o meio intracelular, é capaz de atuar modificando o pH e fazendo com que a célula gaste energia para manter o equilíbrio de maneira ativa. Tal energia poderia ser empregada em processos fisiológicos

microbianos, como o crescimento celular (RABELO, 2010; WANG; SUN; YUAN, 2018; SJULANDER e KIKAS, 2020).

3.5 Destoxificação

Considerando os danos aos organismos e prejuízos gerados pela ação inibitória dos diversos compostos formados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, métodos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico foram desenvolvidos visando a redução total ou parcial da presença e dos efeitos dos inibidores de fermentação (DEVI *et al.*, 2021).

Para isto, podem ser utilizadas metodologias que fazem uso de processos químicos, físicos, físico-químicos ou biológicos. Entretanto, cada via de ação tem sua função específica, trazendo a necessidade de aplicação de mais de uma técnica para a remoção dos compostos indesejáveis (DEVI *et al.*, 2021).

A etapa de destoxificação envolve muitos gastos com produtos e energia, elevando os custos de produção do etanol de segunda geração (LIU *et al.*, 2004; SJULANDER e KIKAS, 2020). Neste sentido, recomenda-se a aplicação de microrganismos capazes de tolerar a presença dos inibidores de fermentação, visando dispensar a destoxificação.

3.6. Fermentação

Os registros históricos de processos fermentativos indicam períodos de 6 mil anos atrás, com a produção de cerveja, onde os açúcares presentes nos cereais eram convertidos em etanol pelas leveduras (PIMENTA *et al.*, 2020).

A fermentação alcoólica consiste em um processo de degradação anaeróbia da glicose e de outros nutrientes orgânicos para obtenção de energia, a qual é conservada na forma de ATP, havendo ainda formação de etanol e gás carbônico (CO₂) (NELSON e COX, 2022).

A ação das enzimas envolvidas com a geração de energia ocorre no citosol, onde após a degradação do açúcar em piruvato, há liberação de uma molécula de gás carbônico a partir da ação da piruvato-descarboxilase, formando acetaldeído

(C₂H₄O). Esta molécula, por sua vez, é convertida em etanol pela álcool-desidrogenase (ADH) com o auxílio do NADH (NELSON e COX, 2022).

As condições ambientais são de extrema importância para a fermentação. Dessa forma, fatores como pH, quantidade de açúcares e nutrientes, pressão e temperatura influenciam diretamente no rendimento e na reprodução dos organismos, devendo ser ajustados de acordo com as necessidades dos microrganismos (AMORIM *et al.*, 2011).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, convencionalmente utilizada em processos industriais devido ao metabolismo versátil e à tolerância ao álcool, apresenta dominância na área de produção de álcool frente a outras espécies, sendo capaz de obter rendimentos acima de 90% (AMORIM *et al.*, 2011).

Contudo, em hidrolisados hemicelulósicos, além das hexoses, há presença de pentoses, as quais não são metabolizadas por este microrganismo. Dessa forma, outras espécies que apresentam potencial fermentativo e características de tolerância a situações de estresse, como altas temperaturas, baixo pH e inibidores de fermentação têm sido alvo de estudos, recebendo a denominação de leveduras não-convencionais (GEIJER; LEDESMA-AMARO; TOMÁS-PEJÓ, 2022).

3.7. *Rhodotorula mucilaginosa*

A levedura não-convencional *Rhodotorula mucilaginosa* é fortemente conhecida pela produção de carotenoides, especialmente b-caroteno e toruleno (AKSU e EREN, 2005; KAWHARA *et al.*, 2013; CHENG e YANG, 2016; BONADIO; FREITA; MUTTON, 2018).

Os carotenoides são pigmentos amplamente presentes na natureza, responsáveis pelas colorações que vão de amarelo a vermelho, além de possuírem propriedades antioxidantes e serem precursores de vitaminas, como é o caso do betacaroteno, precursor da vitamina A. Em razão disso, possuem aplicações industriais, podendo ser empregados em cosméticos, na suplementação humana e na alimentação animal (AKSU e EREN, 2005).

Além dos pigmentos, *R. mucilaginosa* é também utilizada para a produção de biossurfactantes, enzimas e ácidos graxos (AKSU e EREN, 2005; KAWAHARA *et al.*, 2013; LARIO *et al.*, 2020).

Filogeneticamente, *R. mucilaginosa* é classificada na Família

Sporidiobolaceae, Ordem Sporidiobolales, Classe Pucciniomycotina e Filo Basidiomycota, sendo um organismo saprofítico que pode formar ascos e ascósporos em seu ciclo reprodutivo. Esta levedura pode ser encontrada em diferentes ambientes, isto é, desde climas extremos como fundo do mar e desertos árticos até solo, ar ou em associação com plantas (AKSU e EREN, 2005).

Entretanto, apesar de apresentar certa patogenicidade contra pacientes críticos e imunocomprometidos, as cepas aplicadas na indústria não representam uma ameaça à saúde humana (LARIO *et al.*, 2020).

Além da produção de pigmentos, *R. mucilaginosa* também é capaz de assimilar substratos mistos contendo glicose e xilose (JAIBOON *et al.*, 2016). Contudo, o emprego deste microrganismo para a fabricação de etanol de segunda geração ainda é pouco explorado, em que os relatos na literatura são escassos.

4. Material e métodos

4.1. Microrganismo e crescimento de massa

A levedura utilizada foi *Rhodotorula mucilaginosa* L18, pertencente ao banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental, localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, câmpus de Jaboticabal – SP.

Para garantir o crescimento celular de cultura pura, a levedura foi inoculada pelo método de semeadura por estrias em placas de Petri contendo meio YPXD (Yeast Extract-Peptone-Xylose-Dextrose) sólido, o qual é formado por 20 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de glicose, 10 g.L⁻¹ de xilose e 15 g.L⁻¹ de ágar microbiológico (GOVINDASWAMY e VANE, 2007).

Para a obtenção da massa celular para a fermentação, a levedura foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio YPXD líquido (sem ágar). Os frascos foram incubados por 72 horas à 32°C sob agitação orbital de 125 rpm (Incubadora com Agitação Orbital Marconi). Ao final deste período, o meio de cultura foi centrifugado (Centrífuga Himac CR 21G) por 5 min em 5000 rpm. A fração líquida descartada e a massa celular suspendida em solução salina (NaCl 0,85%) e armazenada à 4°C em frasco reagente (GOVINDASWAMY e VANE, 2007).

4.2. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema de parcelas sub-subdivididas com 3 repetições. Os tratamentos principais foram representados pelas substâncias inibitórias Furfural (Sigma-Aldrich 99%), Hidroximetilfurfural (Sigma-Aldrich $\geq 99\%$), Ácido Fênico (Dinâmica Química Contemporânea 99%) e Ácido Levulínico (Sigma-Aldrich 98%), os tratamentos secundários pelas doses ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$) e os tratamentos ternários pelos tempos (0, 6, 12 e 24 horas).

4.3. Preparo e esterilização do mosto

Para a execução dos ensaios foram diluídos 25 g.L^{-1} de xilose e 15 g.L^{-1} de glicose em água destilada e suplementação com sulfato de amônio, fosfato de sódio, sulfato de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de zinco e $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura. Os reagentes foram adicionados proporcionalmente para obtenção de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de Nitrogênio, $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de Fósforo, $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de Potássio, $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de Magnésio, $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de Manganês e $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de Zinco. Utilizou-se solução de H_2SO_4 1N para adequar o pH do meio para 4,5 valor ideal para fermentação com a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L18 segundo BOZZELLI (2021) (não publicado).

O mosto sintético foi esterilizado por calor úmido utilizando-se autoclave (120°C , 1 atm, 20 min) e os inibidores por filtração em membrana filtrante PVDF hidrofílica, com diâmetro de 25 mm e porosidade de 0,22 micras (Millipore, EUA).

4.4. Processo fermentativo

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 100 mL preenchidos com 50 mL de mosto sintético e mantidos em mesa agitadora com controle de temperatura a 32°C e agitação orbital de 150 rpm (Incubadora com Agitação Orbital Marconi). Alíquotas foram coletadas de cada repetição nos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas para análise de cinética de crescimento e cromatografia.

4.5. Cinética de crescimento

4.5.1. Métodos analíticos

O crescimento celular foi monitorado por espectrofotometria quantificando-se a absorbância à 600 nm (Shimadzu, UV mini 1240). A biomassa (g.L^{-1}) foi determinada com base na relação entre absorbância e peso seco da célula (massa celular seca até massa constante) (MARTINI, 2014).

4.5.2. Análise cinética

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_m) foi calculada a partir da plotagem da curva de $\ln(x)$ versus tempo de cultivo (em horas) na fase exponencial, resultando em uma reta com coeficiente angular igual à μ_m . A velocidade específica de crescimento (μ_x) da fase exponencial foi determinada utilizando o método geométrico representado pela equação 1 (SCHMIDELL *et al.*, 2001):

$$(1) \quad \mu_x = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt}$$

Onde:

μ_x : Velocidade específica de crescimento (h^{-1});

x : biomassa ou massa celular (g.L^{-1});

t : tempo (h).

Os fatores de rendimento determinados foram conversão do substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e substrato em produto ($Y_{P/S}$), conforme as equações:

$$(2) \quad Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3) \quad Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

Onde:

($Y_{X/S}$): Rendimento de biomassa baseado no consumo de substrato ($\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{substrato}}$);

($Y_{P/S}$): Rendimento de etanol com base no consumo de substrato ($\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$);

X : Biomassa final (g.L^{-1}); (X_0): biomassa inicial (g.L^{-1});

P : Concentração final de etanol (g.L^{-1}); (P_0): concentração inicial de etanol (g.L^{-1});

S : Concentração final do substrato (g.L^{-1}); (S_0): concentração inicial do substrato (g.L^{-1}).

4.6. Análises cromatográficas

As alíquotas destinadas à cromatografia foram centrifugadas à 500 rpm por 5 min. Os sobrenadantes obtidos foram diluídos (1:10) e armazenados à -4°C .

Posteriormente, as amostras foram passadas em filtro com recheio de sílica (Sep-Pak tC18 Plus Short, com porosidade de 125 Å e retenção de partículas com 37 à 55 µm) (HERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2016).

4.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises de cromatografia líquida foram realizadas em parceria com o Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN), realizadas em coluna Aminex HPX-87H, precedida por pré-coluna Cátion-H (Bio-Rad, Joanesburgo, África do Sul). As concentrações de glicose e xilose das amostras foram determinadas usando um detector de índice de refração (Shodex, RI-101) operado a 65°C, utilizando ácido sulfúrico 5 mM como eluente com taxa de fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ (BRIENZO *et al.*, 2017).

4.6.2 Cromatografia gasosa

As amostras foram submetidas à análise de componentes em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2014, acoplado com software GC Solution com uma coluna Restec modelo Rtx®-1301, 60 m x 0,25 mm. Injetou-se 1µL de cada amostra nas seguintes condições: temperatura do injetor: 200°C, detector FID, temperatura do detector: 240°C, gás de arraste: Nitrogênio; pressão: 186,6 kPa; fluxo: 47,2 mL.min⁻¹; fluxo da coluna: 1,7 mL.min⁻¹, velocidade linear: 30 cm.sec⁻¹. A temperatura da coluna permaneceu por 7,5 minutos a 40°C, aumentando até 220°C, com uma taxa de 10°C.min⁻¹. O composto avaliado foi o etanol.

4.7. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F), teste de comparação de médias (Tukey 5%) utilizando o Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomicos - AgroEstat (BARBOSA e MALDONADO, 2015).

5. Resultados e discussão

5.1. Cinética de crescimento

De modo a definir os impactos de cada inibidor de fermentação no crescimento celular de *Rhodotorula mucilaginosa* L18, é essencial a determinação de alguns parâmetros, como velocidades de crescimento, produção de biomassa e velocidade de consumo de substrato (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros avaliados para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido Fênico e Ácido Levulínico, para Velocidade Específica Máxima de Crescimento (μ_m), Velocidade Específica de Crescimento (μ_x); Velocidade de Consumo de Glicose (Q_g) e Velocidade de Consumo de Xilose (Q_x).

Inibidores	Doses (g.L ⁻¹)	(μ_m .h ⁻¹)*	(μ_x .h ⁻¹)	X - X ₀ (g.L ⁻¹)**	Q _g (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^A	Q _x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^B
Controle	0,0	0,024 ± 0,001	0,010 ± 0,000	0,270	0,155	0,238
Furfural	0,1	0,026 ± 0,001	0,011 ± 0,000	0,320	0,109	0,198
	0,5	0,026 ± 0,001	0,011 ± 0,000	0,330	0,055	0,136
	1,0	0,025 ± 0,000	0,011 ± 0,000	0,310	0,084	0,255
	1,5	0,025 ± 0,000	0,011 ± 0,000	0,290	0,107	0,184
	2,0	0,025 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,320	0,105	0,170
HMF	0,1	0,024 ± 0,001	0,011 ± 0,000	0,300	0,311	0,498
	0,5	0,025 ± 0,001	0,011 ± 0,000	0,320	0,079	0,102
	1,0	0,025 ± 0,001	0,010 ± 0,000	0,320	0,144	0,269
	1,5	0,024 ± 0,001	0,010 ± 0,000	0,290	0,171	0,306
	2,0	0,024 ± 0,000	0,010 ± 0,000	0,290	0,162	0,296
Ácido fênico	0,1	0,023 ± 0,000	0,011 ± 0,000	0,280	0,115	0,194
	0,5	0,025 ± 0,001	0,010 ± 0,000	0,320	0,127	0,234
	1,0	0,024 ± 0,000	0,010 ± 0,000	0,280	0,145	0,261
	1,5	0,024 ± 0,001	0,010 ± 0,000	0,280	0,108	0,204
	2,0	0,024 ± 0,000	0,010 ± 0,000	0,280	0,091	0,177
Ácido levulínico	0,1	0,023 ± 0,001	0,010 ± 0,000	0,260	0,186	0,334
	0,5	0,023 ± 0,000	0,011 ± 0,000	0,310	0,048	0,101
	1,0	0,029 ± 0,012	0,013 ± 0,005	0,340	0,113	0,219
	1,5	0,022 ± 0,003	0,010 ± 0,000	0,290	0,065	0,095
	2,0	0,025 ± 0,000	0,011 ± 0,000	0,280	0,558	1,010

*Intervalo de tempo usado para determinação de μ_m : 0-12h

**Diferença entre os valores de biomassa em 24h (X) e 0h (X₀) de incubação

^A (Glicose inicial - Glicose final)/24h

^B (Xilose inicial - Xilose final)/24h

De acordo com a Tabela 1, é possível observar que em todos os ensaios com furfural, a velocidade específica máxima de crescimento mostrou-se igual ou superior ao valor obtido para o tratamento controle.

A produção de biomassa foi superior ao meio livre de contaminantes para todas as doses de furfural testadas, com o menor valor observado em 1,5 g.L⁻¹. A velocidade de consumo de glicose, por sua vez, foi menor que o apresentado pelo

controle negativo em todos os casos, enquanto para a xilose observou-se o comportamento contrário. Este padrão de consumo de açúcares foi verificado para todos os inibidores.

Para o HMF, a velocidade específica máxima de crescimento foi igual à obtida para o controle. Além disso, a concentração de biomassa foi superior ao meio sem inibidores para todas as doses de HMF. Já o maior consumo de substrato ocorreu na dosagem de 0,1 g.L⁻¹, seguido por uma queda em 0,5 g.L⁻¹ e novo aumento nas demais concentrações (Tabela 1).

Nos tratamentos com ácido fênico, observou-se valores iguais aos obtidos na ausência do inibidor, assim como na velocidade específica de crescimento. (Tabela 1).

Em relação à biomassa, verificou-se que na presença do ácido fênico houve a produção mais próxima ao controle negativo, em que a maior concentração celular foi no ensaio com 0,5 g.L⁻¹, havendo queda nas demais doses. Além disso, a menor velocidade de consumo dos açúcares ocorreu em 2,0 g.L⁻¹, tanto para a glicose quanto para a xilose (Tabela 1).

Na presença de ácido levulínico, observou-se a maior variação nos valores de velocidade específica máxima de crescimento, sendo inferior ao controle nas doses de 0,1 g.L⁻¹, 0,5 g.L⁻¹ e 1,5 g.L⁻¹ e superior nos ensaios com 1,0 e 2,0 g.L⁻¹. Assim como observado para velocidade específica máxima de crescimento, a produção de biomassa e a velocidade específica de crescimento também exibem variações de acordo com as concentrações do ácido, sendo os maiores valores destes parâmetros na dose de 1,0 g.L⁻¹ (Tabela 1).

Dessa forma, estes resultados sugerem que a levedura *R. mucilaginosa* L18 foi capaz de crescer mesmo na presença dos compostos tóxicos, uma vez que, de forma geral, em todos os tratamentos as velocidades de crescimento e a produção de biomassa foram superiores ao valor obtido quando na ausência dos inibidores de fermentação. Outras espécies de leveduras oleaginosas apresentaram baixíssimo crescimento de massa em meios com quantidades acima de 1,0 g.L⁻¹ de furfural, como as espécies *Cryptococcus curvatus* e *Lipomyces starkeyi* (PARK et al., 2023), por sua vez, a *R. mucilaginosa* L18 apresentou valores positivos em até 2,0 g.L⁻¹.

Além disso, o consumo de xilose confirma a habilidade desta levedura em metabolizar pentoses. Diferentemente do observado por Bura *et al.* (2012) com *R. mucilaginosa* PTD3, a cepa L18 mostrou velocidade de consumo de xilose maior que a de glicose, sendo capaz de consumir o substrato disponível em um ambiente com a presença de inibidores de fermentação.

A Tabela 2 traz os resultados médios da produção de biomassa para as diferentes doses de inibidores ao longo do tempo.

Tabela 2. Resultados médios e análise de variância para a concentração de Biomassa Produzida para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido Fênico e Ácido Levulínico durante 24 horas.

Tratamentos	Biomassa produzida (g.L ⁻¹)
Inibidor (I)	
Furfural	1,29 a
Hidroximetilfurfural	1,27 ab
Ácido fênico (fenol)	1,27 bc
Ácido levulínico	1,24 c
Teste F	11,77**
C.V.	3,9216
D.M.S.	0,0264
Doses (D)	
0,0	1,26 a
0,1	1,26 a
0,5	1,27 a
1,0	1,26 a
1,5	1,25 a
2,0	1,27 a
Teste F	2,00 ns
C.V.	3,9216
D.M.S.	0,0248
Tempos (T)	
0 horas	1,05 a
6 horas	1,33 b
12 horas	1,33 b
24 horas	1,35 c
Teste F	7581,06**
C.V.	1,1145
D.M.S.	0,0061
I x D	2,54**
I x T	2,18*
D x T	5,39**
I x D x T	1,58*

**significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (5%). p = Diferença significativa entre o percentual médio. C.V. = coeficiente de variação. D.M.S. = desvio mínimo significativo. I x D = Interação entre inibidores e doses. I x T = Interação entre inibidores e tempos. D x T = Interação entre doses e tempos. I x D x T = Interação entre inibidores, doses e tempos.

Dessa forma, verificou-se que a maior produção ocorreu para os tratamentos com furfural, enquanto a menor se deu na presença de ácido levulínico. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes doses testadas. Além disso, a produção aumenta no período de 0 a 6 horas, indicando a fase exponencial do crescimento microbiano.

De acordo com a Figura 1, é notável que a maior produção de biomassa ocorreu nos ensaios com os derivados de furanos furfural e HMF, não havendo diferenças significativas entre as doses, porém foi ligeiramente superior ao valor observado para o tratamento controle. Contrastando com os resultados obtidos nesta pesquisa, Sitepu *et al.* (2014) não verificaram crescimento celular na presença de 0,5 e 1,0 g.L⁻¹ furfural para uma cepa de *R. mucilaginosa*.

Já os tratamentos com ácido fênico, atingiram a mesma concentração de biomassa obtida no meio livre de contaminantes, enquanto a produção em ensaios com ácido levulínico foi significativamente menor, principalmente nas doses de 1,0 e 1,5 g.L⁻¹ deste inibidor de fermentação (Figura 1).

Considerando as Figuras 2 e 3, verificou-se que para todos os inibidores em todas as doses avaliadas a maior produção de biomassa foi no período de 0 a 6 horas, mantendo-se sem maiores aumentos até o final do processo fermentativo.

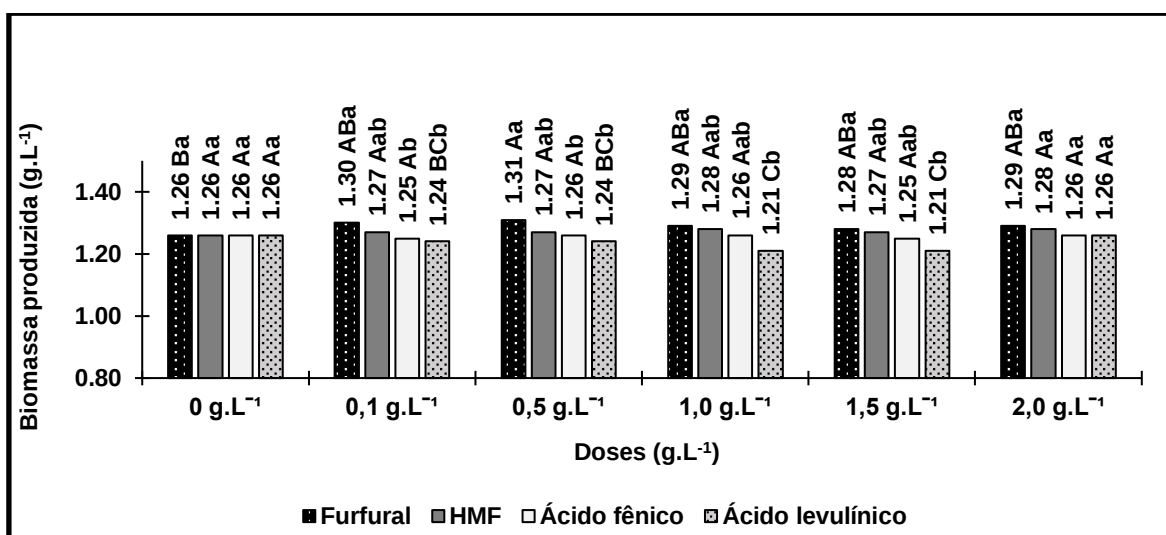


Figura 1. Desdobramento da interação entre inibidores e doses para a Concentração de Biomassa produzida para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação. Letras minúsculas comparam doses dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada dose.

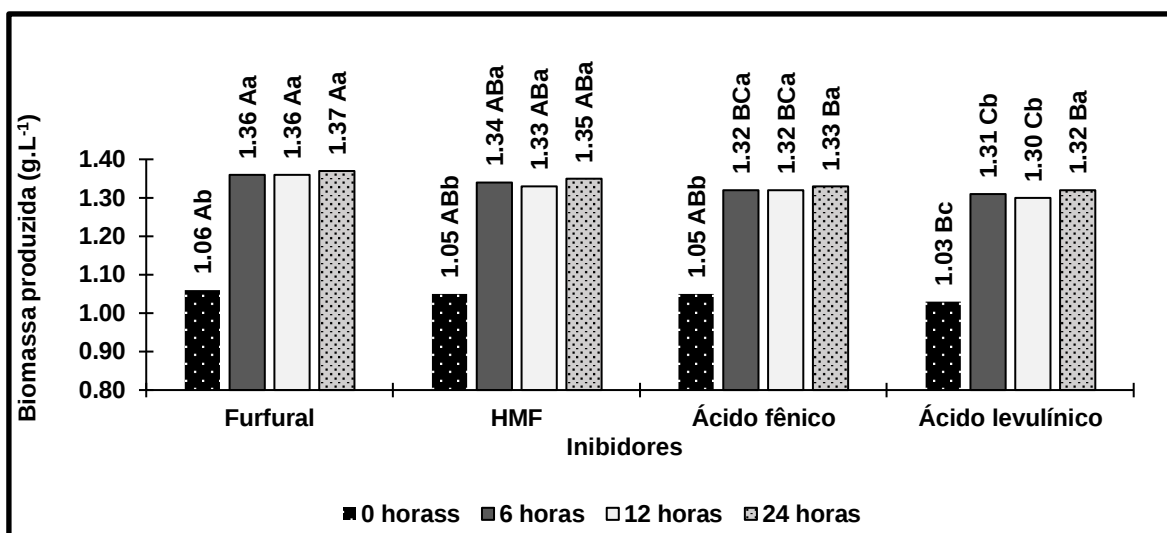


Figura 2. Desdobramento da interação entre inibidores e tempo para a Concentração de Biomassa produzida para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada tempo.

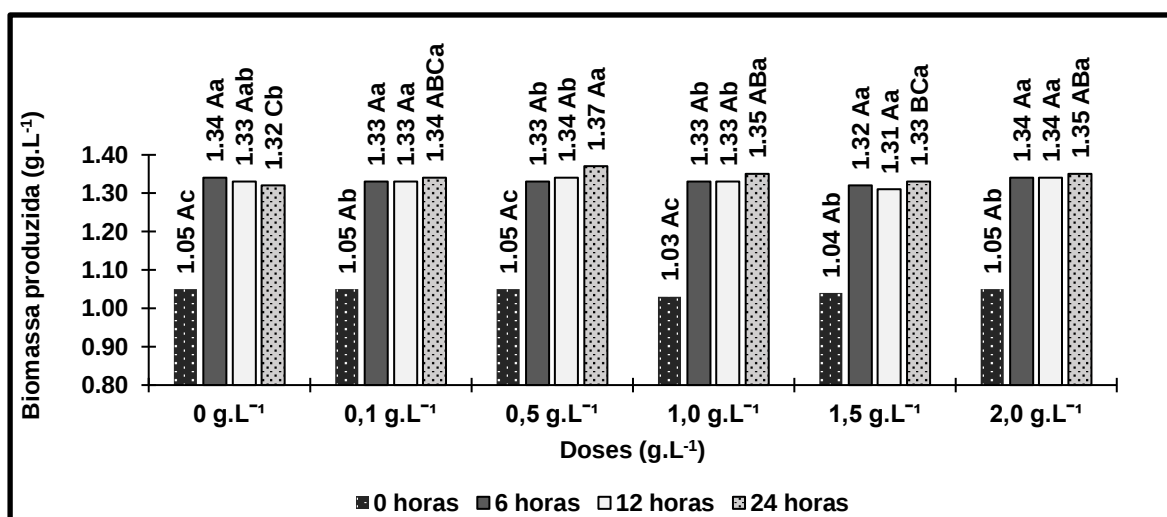


Figura 3. Desdobramento da interação entre doses e tempos para a Concentração de Biomassa produzida para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada dose e letras maiúsculas comparam doses dentro de cada tempo.

Lin et al. (2017) ao utilizar hidrolisado de sabugo de milho observaram que a cepa *Rhodotorula glutinis* CGMCC teve seu crescimento celular reduzido quando na presença de inibidores. Entretanto, de acordo com resultados obtidos nesta presente pesquisa, verificou-se a maior tolerância de *R. mucilaginosa* L18 em tais condições estressantes.

A Tabela 3 traz os resultados médios de rendimento de biomassa baseado no consumo de substrato ($Y_{X/S}$) considerando os tempos de 6, 12 e 24 horas, uma vez que no tempo 0 horas ainda não há consumo de açúcares.

Tabela 3. Resultados médios e desvio padrão para o Rendimento de Biomassa Baseado no Consumo de Substrato ($Y_{X/S}$) para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido Fênico e Ácido Levulínico durante 24 horas.

Doses (g.L ⁻¹)	Tempo	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)			
		Furfural	HMF	Ácido fênico	Ácido levulínico
0,0	6h	0,0041 ± 0,0002	0,0041 ± 0,0002	0,0041 ± 0,0002	0,0041 ± 0,0002
	12h	0,0040 ± 0,0002	0,0040 ± 0,0002	0,0040 ± 0,0002	0,0040 ± 0,0002
	24h	0,0038 ± 0,0001	0,0038 ± 0,0001	0,0038 ± 0,0001	0,0038 ± 0,0001
0,1	6h	0,0044 ± 0,0004	0,0042 ± 0,0002	0,0039 ± 0,0001	0,0039 ± 0,0001
	12h	0,0044 ± 0,0002	0,0042 ± 0,0001	0,0039 ± 0,0002	0,0038 ± 0,0003
	24h	0,0047 ± 0,0000	0,0043 ± 0,0002	0,0040 ± 0,0001	0,0038 ± 0,0003
0,5	6h	0,0044 ± 0,0003	0,0042 ± 0,0002	0,0040 ± 0,0002	0,0036 ± 0,0002
	12h	0,0045 ± 0,0003	0,0041 ± 0,0003	0,0040 ± 0,0001	0,0039 ± 0,0002
	24h	0,0047 ± 0,0002	0,0045 ± 0,0001	0,0045 ± 0,0001	0,0044 ± 0,0002
1,0	6h	0,0043 ± 0,0001	0,0042 ± 0,0000	0,0039 ± 0,0001	0,0045 ± 0,0013
	12h	0,0043 ± 0,0001	0,0042 ± 0,0001	0,0040 ± 0,0001	0,0045 ± 0,0015
	24h	0,0044 ± 0,0000	0,0045 ± 0,0000	0,0041 ± 0,0001	0,0050 ± 0,0015
1,5	6h	0,0042 ± 0,0001	0,0040 ± 0,0002	0,0040 ± 0,0001	0,0036 ± 0,0005
	12h	0,0042 ± 0,0001	0,0041 ± 0,0001	0,0040 ± 0,0001	0,0035 ± 0,0005
	24h	0,0042 ± 0,0001	0,0042 ± 0,0001	0,0040 ± 0,0001	0,0040 ± 0,0000
2,0	6h	0,0042 ± 0,0002	0,0040 ± 0,0001	0,0041 ± 0,0000	0,0043 ± 0,0001
	12h	0,0043 ± 0,0001	0,0040 ± 0,0000	0,0039 ± 0,0001	0,0042 ± 0,0001
	24h	0,0046 ± 0,0006	0,0041 ± 0,0001	0,0041 ± 0,0001	0,0041 ± 0,0001

Dessa forma, observou-se que, de modo geral, o rendimento de biomassa baseado no consumo de substrato aumentou ao longo das 24 horas. Além disso, nos ensaios com derivados de furanos verificou-se que os rendimentos nos diferentes intervalos de tempo considerados foram superiores ao controle negativo (Tabela 3).

Por outro lado, os tratamentos com ácido fênico exibiram valores de $Y_{X/S}$ mais próximos aos obtidos quando na ausência de inibidores, enquanto nas concentrações de 0,1 g.L⁻¹, 0,5 g.L⁻¹ e 1,5 g.L⁻¹ de ácido levulínico foram observados

rendimentos de biomassa baseados no consumo de substratos abaixo dos valores verificados para o controle negativo (Tabela 3).

Na Tabela 4 estão dispostos os resultados médios para as concentrações dos substratos glicose e xilose ao longo do processo fermentativo.

Tabela 4. Resultados médios e análise de variância para a concentrações de Glicose e Xilose para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido Fênico e Ácido Levulínico durante 24 horas.

Tratamentos	Glicose (g.L ⁻¹)	Xilose (g.L ⁻¹)
Inibidor (I)		
Furfural	14,05 a	25,87 a
Hidroximetilfurfural	13,12 b	23,48 b
Ácido fênico (fenol)	12,47 c	22,77 c
Ácido levulínico	12,52 c	23,05 c
Teste F	216,04**	795,01**
C.V.	2,6677	1,4621
D.M.S.	0,2891	0,2891
Doses (D)		
0,0	12,67 f	23,47 e
0,1	13,54 a	24,27 a
0,5	12,94 d	24,1 b
1,0	13,20 b	24,00 c
1,5	12,70 e	23,15 f
2,0	13,18 c	23,75 d
Teste F	432551,60**	676042,58**
C.V.	0,0221	0,0121
D.M.S.	0,0023	0,0023
Tempos (T)		
0 horas	14,54 a	26,47 a
6 horas	13,54 b	24,30 b
12 horas	12,54 c	23,26 c
24 horas	11,52 d	21,14 d
Teste F	9718977,53**	28235050,60**
C.V.	0,0221	0,0121
D.M.S.	0,0015	0,0015
I x D	347397,79**	1224644,05**
I x T	189312,17**	490144,27**
D x T	171056,12**	373665,77**
I x D x T	114070,05**	326815,23**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (5%). p = Diferença significativa entre o percentual médio. C.V. = coeficiente de variação. D.M.S. = desvio mínimo significativo. I x D = Interação entre inibidores e doses. I x T = Interação entre inibidores e tempos. D x T = Interação entre doses e tempos. I x D x T = Interação entre inibidores, doses e tempos.

Dessa forma, observou-se que entre o ácido fênico e o ácido levulínico não há diferenças significativas, enquanto os derivados de furanos diferem dos demais inibidores. Entretanto, todas as doses exibem distinções estatísticas entre si, em

que o maior consumo de glicose ocorreu na ausência dos compostos tóxicos, enquanto para a xilose ocorreu em 1,5 g.L⁻¹. Além disso, como esperado, as concentrações da hexose e da pentose diminuíram ao final das 24 horas de fermentação (Tabela 4).

Em relação ao consumo de glicose, é possível notar que nos tratamentos com HMF houve o maior consumo deste açúcar. Já o menor consumo se deu nos ensaios com ácido fênico e ácido levulínico (Figura 4). Além disso, o consumo de glicose aumentou significativamente com o passar do tempo em todos os tratamentos (Figuras 5 e 6).

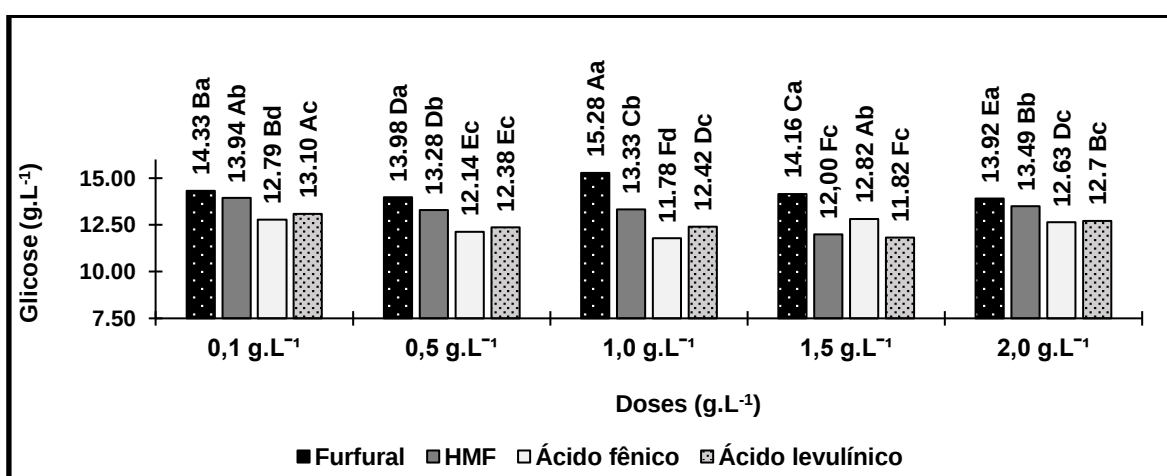


Figura 4. Desdobramento da interação entre inibidores e doses para a Concentração de Glicose para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação. Letras minúsculas comparam doses dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada dose.

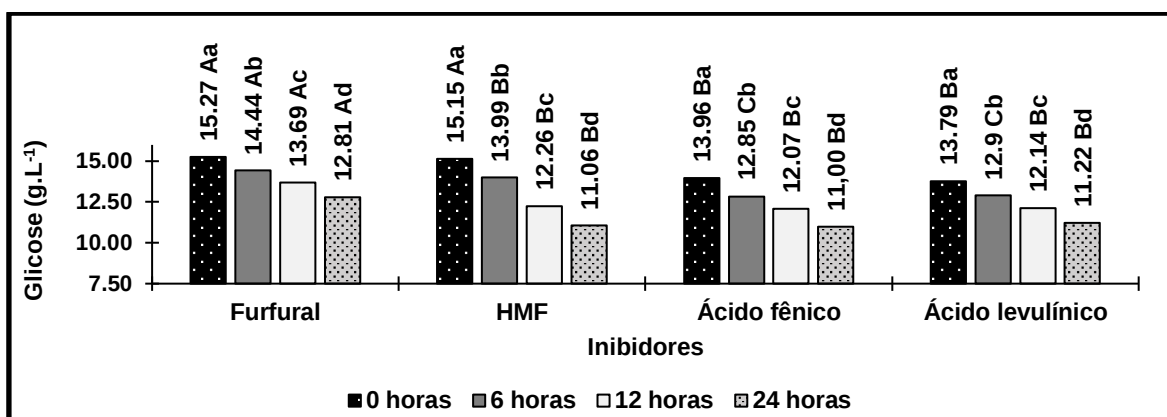


Figura 5. Desdobramento da interação entre inibidores e tempos para a Concentração de Glicose para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada tempo.

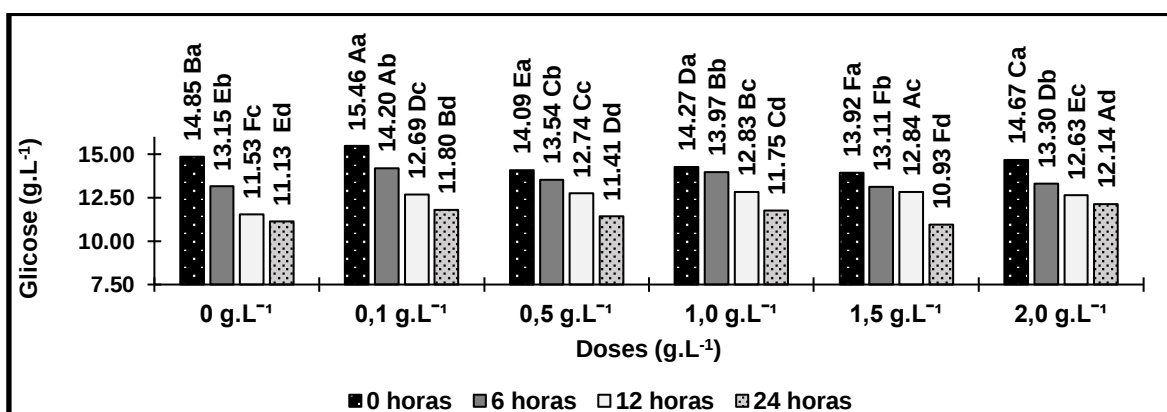


Figura 6. Desdobramento da interação entre doses e tempos para a Concentração de Glicose para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada dose e letras maiúsculas comparam doses dentro de cada tempo.

A concentração de xilose, por sua vez, mostrou-se menor nos tratamentos contendo as diferentes doses de HMF, ácido fênico e ácido levulínico, indicando que na presença destes inibidores houve o maior consumo da pentose. Nos ensaios com furfural verificou-se as maiores concentrações deste açúcar e, conseqüentemente, o menor consumo (Figura 7).

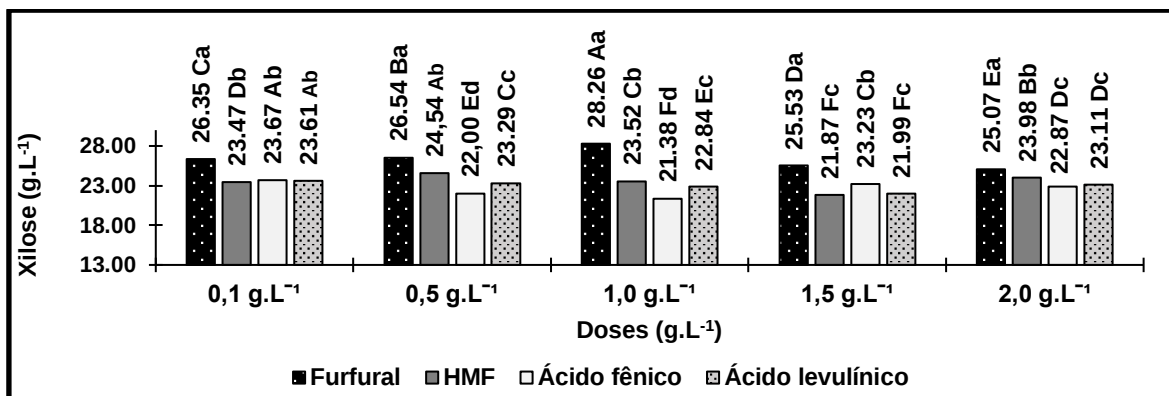


Figura 7. Desdobramento da interação entre inibidores e doses para a Concentração de Xilose para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação. Letras minúsculas comparam doses dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada dose.

Ao longo das 24 horas consideradas para a duração dos ensaios fermentativos verificou-se que a concentração de xilose diminuiu de maneira mais expressiva nos ensaios com ácido fênico, ácido levulínico e HMF, especialmente na presença deste último. Para o furfural, o consumo se deu em taxas menores (Figura 8). Além disso, a dose de 0,1 g.L⁻¹ foi responsável por apresentar o maior consumo de xilose em relação às demais concentrações de inibidores testadas (Figura 9).

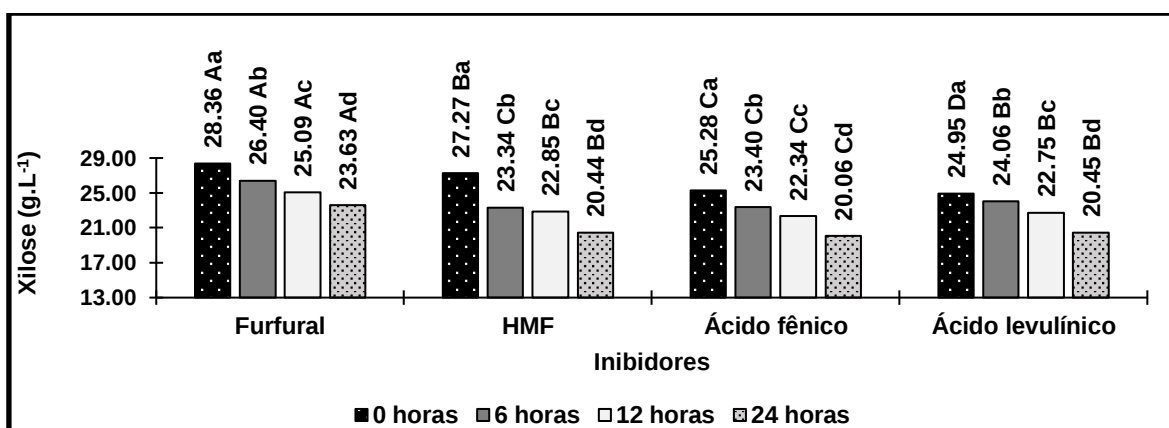


Figura 8. Desdobramento da interação entre inibidores e tempos para a Concentração de Xilose para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada tempo.

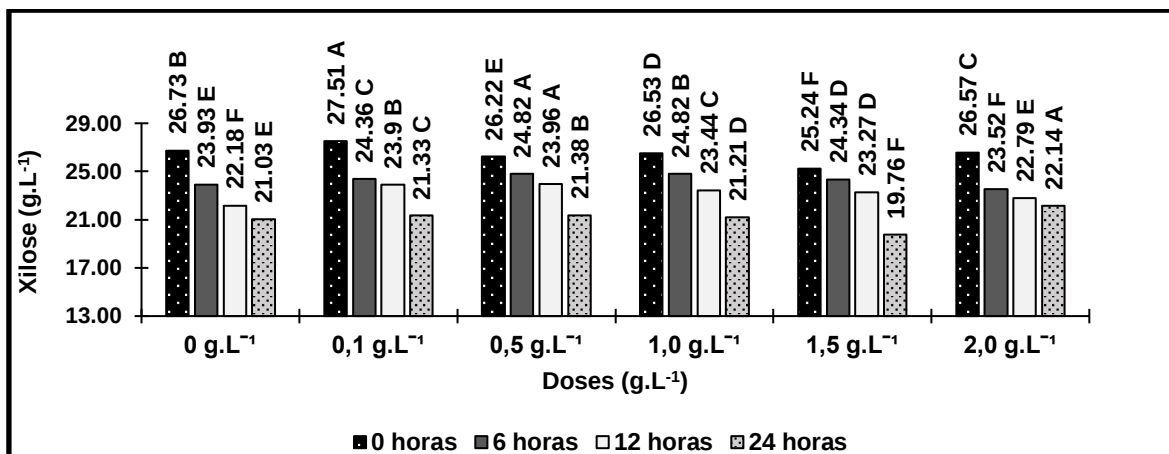


Figura 9. Desdobramento da interação entre doses e tempos para a Concentração de Xilose para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada dose e letras maiúsculas comparam doses dentro de cada tempo.

Dessa forma, além do consumo natural de glicose, a levedura *R. mucilaginosa* L18 também se mostrou capaz de consumir a pentose em uma taxa semelhante à de consumo da hexose. O trabalho desenvolvido por Bura *et al.* (2012), ao estudar uma cepa desta mesma espécie, corrobora com os resultados da presente pesquisa.

5.2. Produção de etanol

Ainda que uma parcela expressiva de leveduras apresente a habilidade de assimilar a xilose, somente em torno de 1% é capaz de realizar a conversão deste açúcar em etanol, isto é, realizar o processo fermentativo (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006). Neste sentido, a Tabela 5 traz os resultados médios da produção de etanol ao longo de 24 horas de fermentação.

Tabela 5. Resultados médios e análise de variância para a concentração de Etanol para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido Fênico e Ácido Levulínico durante 24 horas.

Tratamentos	Etanol (g.L ⁻¹)
Inibidor (I)	
Furfural	0,098 a
Hidroximetilfurfural	0,076 a
Ácido fênico (fenol)	0,103 a
Ácido levulínico	0,096 a
Teste F	1,66NS
C.V.	58,6843
D.M.S.	0,0524
Doses (D)	
0,0	0,082 c
0,1	0,079 c
0,5	0,122 a
1,0	0,09 b
1,5	0,092 b
2,0	0,092 b
Teste F	379,27**
C.V.	4,1044
D.M.S.	0,0035
Tempos (T)	
6 horas	0,13 a
12 horas	0,064 c
24 horas	0,085 b
Teste F	3113,64**
C.V.	4,4783
D.M.S.	0,0021
I x D	445,90**
I x T	519,37**
D x T	1283,23**
I x D x T	386,29**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (5%). p = Diferença significativa entre o percentual médio. C.V. = coeficiente de variação. D.M.S. = desvio mínimo significativo. I x D = Interação entre inibidores e doses. I x T = Interação entre inibidores e tempos. D x T = Interação entre doses e tempos. I x D x T = Interação entre inibidores, doses e tempos.

Observa-se que não houve diferença significativa na produção de etanol entre os tratamentos com inibidores da fermentação. (Tabela 5).

Em relação às doses testadas, é possível notar que estas diferem estatisticamente entre si, em que na dosagem de 0,5 g.L⁻¹ a produção alcoólica foi superior às demais. Contudo, apesar da maior concentração de etanol no tempo 6 horas, ocorreu a queda do produto com o passar do tempo. Isto pode indicar a metabolização do etanol como fonte de carbono pela levedura (Tabela 5).

De acordo com a Figura 10, obteve-se que nos ensaios com inibidores a produção de etanol variou significativamente entre as dosagens.

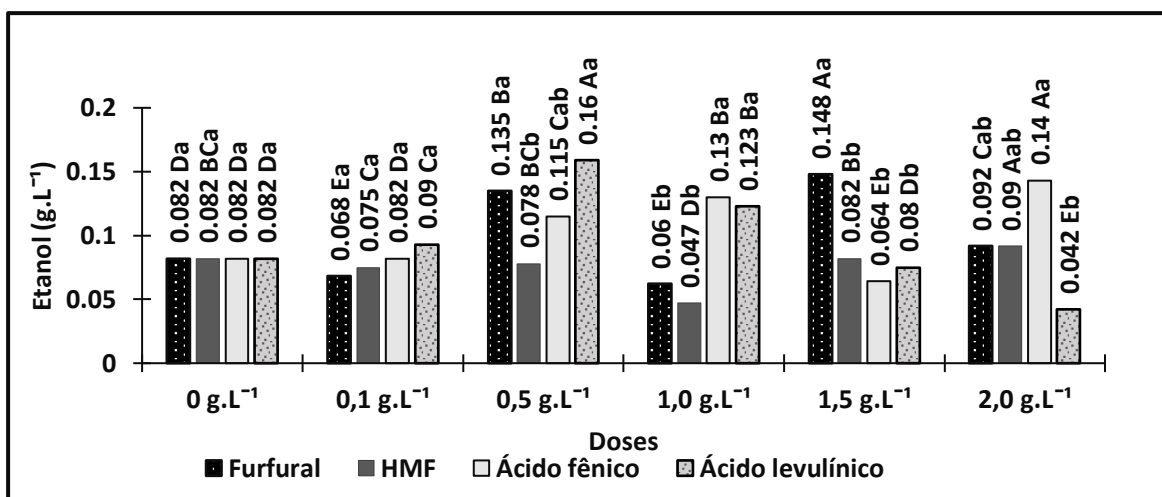


Figura 10. Desdobramento da interação entre inibidores e doses para a Concentração de Etanol para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação. Letras minúsculas comparam doses dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada dose.

Os tratamentos com furfural exibiram concentrações alcoólicas abaixo do controle em 0,1 e 1,0 g.L⁻¹, e valores acima nas demais dosagens (Figura 10). Este comportamento pode estar associado ao baixo consumo de açúcares observado nos ensaios com este inibidor. Além disso o furfural apresentou o maior rendimento de biomassa a partir do consumo de substrato, sugerindo que a levedura priorizou a multiplicação celular ao invés da produção de etanol. Bura *et al.* (2012) reforçam o efeito negativo deste inibidor no rendimento de etanol.

Os tratamentos com hidroximetilfurfural apresentaram valores semelhantes ao controle e significativamente abaixo em 1,0 g.L⁻¹.

Enquanto os tratamentos com ácido levulínico apresentaram os valores mais baixos com o aumento das dosagens, os tratamentos com ácido fênico se mantiveram com a produção acima do controle, exceto na dosagem de 1,5 g.L⁻¹ (Figura 11).

Contudo, sabe-se que a fermentação alcoólica da xilose não é intrínseca a todas as cepas de uma espécie. Assim, ao verificar que cepas de *R. mucilaginosa* apresentavam a via para fermentação de xilose, um estudo avaliou 21 cepas desta

levedura, porém nenhuma produziu etanol (JAIBOON *et al.*, 2016). Isto contrasta com os resultados obtidos para *R. mucilaginosa* L18, a qual além de assimilar pentoses, também possui a habilidade de realizar a fermentação alcoólica.

É notável que a produção de etanol diminui com o passar do tempo, com a maior produção alcoólica sendo realizada nas primeiras horas, isso se modifica com o aumento das dosagens dos tratamentos, sendo observada a maior presença de etanol passadas 24 horas em 2,0 g.L⁻¹ (Figura 12).

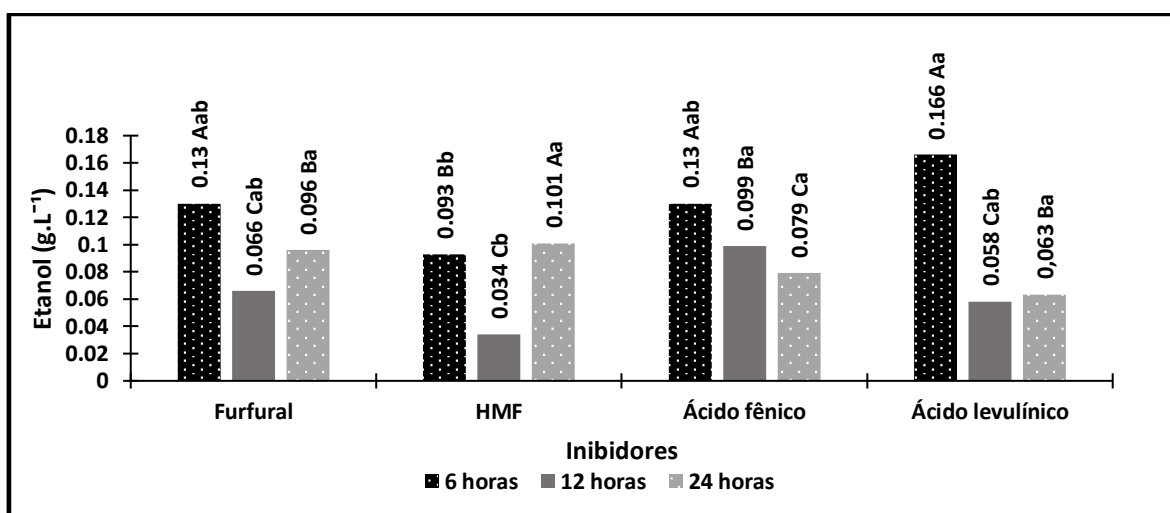


Figura 11. Desdobramento da interação entre inibidores e tempos para a Concentração de Etanol para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada tempo.

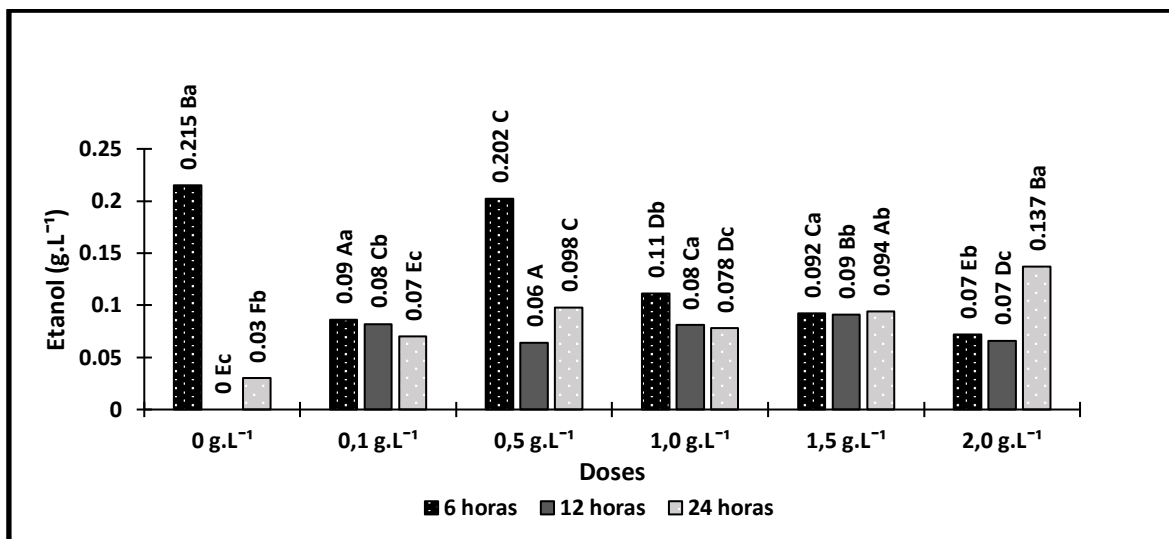


Figura 12. Desdobramento da interação entre doses e tempos para a Concentração de Etanol para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada dose e letras maiúsculas comparam doses dentro de cada tempo.

A Tabela 6 traz os resultados médios de rendimento de etanol baseado no consumo de substrato ($Y_{P/S}$) considerado os tempos de 6, 12 e 24 horas. Assim, é possível notar que em vários tratamentos o rendimento diminuiu ao longo do tempo.

Tabela 6. Resultados médios e desvio padrão para o Rendimento de Etanol Baseado no Consumo de Substrato ($Y_{P/S}$) para *Rhodotorula mucilaginosa* L18 em ensaios fermentativos com doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido Fênico e Ácido levulínico durante 24 horas.

Doses (g.L ⁻¹)	Tempo	Y _{P/S} (g.g ⁻¹)			
		Furfural	HMF	Ácido fênico	Ácido levulínico
0,0	6h	0,00307 ± 0,0002	0,00307 ± 0,0002	0,00307 ± 0,0002	0,00307 ± 0,0002
	12h	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000
	24h	0,00043 ± 0,0002	0,00043 ± 0,0002	0,00043 ± 0,0002	0,00043 ± 0,0002
0,1	6h	0,00064 ± 0,0002	0,00164 ± 0,0002	0,00171 ± 0,0002	0,00093 ± 0,0002
	12h	0,00078 ± 0,0002	0,00079 ± 0,0002	0,00086 ± 0,0002	0,00229 ± 0,0002
	24h	0,00150 ± 0,0002	0,00079 ± 0,0002	0,00093 ± 0,0002	0,00079 ± 0,0002
0,5	6h	0,00421 ± 0,0002	0,00136 ± 0,0002	0,00279 ± 0,0002	0,00321 ± 0,0002
	12h	0,00064 ± 0,0002	0,00079 ± 0,0002	0,00071 ± 0,0002	0,00154 ± 0,0002
	24h	0,00093 ± 0,0002	0,00121 ± 0,0002	0,00143 ± 0,0002	0,00207 ± 0,0002
1,0	6h	0,00171 ± 0,0002	0,00036 ± 0,0002	0,0005 ± 0,0002	0,00379 ± 0,0002
	12h	0,00057 ± 0,0002	0,00029 ± 0,0002	0,0030 ± 0,0002	0,00079 ± 0,0002
	24h	0,00036 ± 0,0002	0,00136 ± 0,0002	0,00207 ± 0,0002	0,00071 ± 0,0002
1,5	6h	0,00107 ± 0,0002	0,00086 ± 0,0002	0,00157 ± 0,0002	0,00214 ± 0,0002
	12h	0,00271 ± 0,0002	0,00057 ± 0,0002	0,00157 ± 0,0002	0,00036 ± 0,0002
	24h	0,00257 ± 0,0002	0,00211 ± 0,0002	0,0000 ± 0,0000	0,00071 ± 0,0002
2,0	6h	0,00057 ± 0,0002	0,00064 ± 0,0002	0,00186 ± 0,0002	0,00107 ± 0,0002
	12h	0,00093 ± 0,0002	0,00050 ± 0,0002	0,00236 ± 0,0002	0,0000 ± 0,0000
	24h	0,00243 ± 0,0002	0,00279 ± 0,0002	0,00193 ± 0,0002	0,00071 ± 0,0002

A produção de etanol por *R. mucilaginosa* L18 pode ser considerada baixa quando comparada a outras leveduras não-convencionais. Resultados semelhantes foram demonstrados por Nandal et al. (2020), em que *Rhodotorula glutinis* Y1 foi menos eficiente no processo fermentativo em comparação à *Candida tropicalis* e *Pichia stipitis*. Já *Pichia membranifaciens* produziu até 7,6 g.L⁻¹ (RIBEIRO, 2019).

Entretanto, apesar de não apresentar elevada produção alcoólica, a cepa L18 mostrou-se capaz de sobreviver e se multiplicar mesmo na presença dos inibidores de fermentação, exibindo crescimento celular igual ou superior ao meio sem contaminantes para todas as doses testadas.

6. Conclusão

Considerando-se os resultados obtidos, pode-se concluir que *Rhodotorula mucilaginosa* L18 apresentou crescimento celular igual ou superior ao controle negativo em todas as doses de inibidores de fermentação avaliadas. O ácido levulínico foi o inibidor que levou à menor produção de biomassa.

A levedura não apresentou diferença na produção de etanol entre os tratamentos com diferentes inibidores, tendo como o maior período de produção alcoólica as primeiras seis horas observadas.

Apesar de sua capacidade de crescimento e consumo de açúcares em meios com a presença de inibidores, a levedura *R. mucilaginosa* L18 apresentou um baixo rendimento na produção de etanol quando comparada a outras leveduras não-convencionais.

Contudo a levedura mostrou-se tolerante frente a exposição aos inibidores da fermentação principalmente na capacidade de se multiplicar e de metabolizar glicose e xilose.

7. Referências

AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2985-2991, 2005.

ALLEN, S. A.; CLARK, W.; McCAFFERY, J. M.; CAI, Z.; LANCTOT, A.; SLININGER, P. J.; LIU, Z. L.; GORSICH, S. W. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1-10, 2010.

ALVES, R. C. **Influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar na solubilização de hemicelulose e produção de açúcares fermentáveis**. 2018. 64f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro. 2018.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, J. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.

BARBOSA, J.C.; MALDONADO JUNIOR, W. **Experimentação Agrônômica & AgroEstat – Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos**. FUNEP: Jaboticabal, 2015.

BONADIO, M. P.; FREITA, L. A.; MUTTON, M. J. R. Carotenoid production in sugarcane juice and synthetic media supplemented with nutrients by *Rhodotorula rubra* I02. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 872-878, 2018.

BOZZELLI, J. PRODUÇÃO DE ETANOL 2G ATRAVÉS DE LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS UTILIZANDO LICOR HEMICELULÓSICO DE SORGO SACARINO. Não publicado.

BRIENZO, M. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos**. 2010. 137f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Universidade de São Paulo (Usp), Lorena. 2010.

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.

BURA, R.; VAJZOVIC, A.; DOTY, S. L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 7, p. 1003-1011, 2012.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F., FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; DA SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

CARPIO, L. G. T.; DE SOUZA, F. S. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second-generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. **Renewable Energy**, v. 111, p. 771-780, 2017.

CHANDEL, A. K.; ALBARELLI, J. Q.; SANTOS, D. T.; CHUNDAWAT, S. P.; PURI, M.; MEIRELES, M. A. A. Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 4, p. 994-1014, 2019.

CHENG, Y-T.; YANG, C-F.; Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 61, p. 270-275, 2016.

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**, v. 9, n. 5, p. 105798, 2021.

GEIJER, C.; LEDESMA-AMARO, R.; TOMÁS-PEJÓ, E. Unraveling the potential of non-conventional yeasts in biotechnology. **FEMS Yeast Research**, v. 22, n. 1, p. foab071, 2022.

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, p. 677-685, 2007.

GUALBERTO, N.C.; NOGUEIRA, J.P.; SILVA, A.S.; BARBOSA, P.F.; MATOS, C. M. S.; MURUGAN RAJAN, M.; LEITE, M. T. S.; NARAIN, N. Optimization of the biotechnological process using *Rhodotorula mucilaginosa* and acerola (*Malpighia emarginata* L.) seeds for the production of bioactive compounds. **LWT**, v. 160, 2022.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol - The fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F.; DE 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, p. 489-496, 2016.

JAIBOON, K.; LERTWATTANASAKUL, N.; LIMTONG, P.; LIMNTOG, S. Yeasts from peat in a tropical peat swamp forest in Thailand and their ability to produce ethanol, indole-3-acetic acid and extracellular enzymes. **Mycol Progress**, v. 15, p. 755-770, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. In: **Biologia celular e molecular**. 2012. p. 261-270.

KAWAHARA, H.; HIRAI, A.; MINABE, T.; OBATA, H. Stabilization of astaxanthin by a novel biosurfactant produced by *Rhodotorula mucilaginosa* KUGPP-1. **Biocontrol Science**, v. 18, n. 1, p. 21-28, 2013.

LARIO, L. D.; PILLACA-PULLO, O. S.; SETTE, L. D.; CONVERTI, A.; CASATI, P.; SPAMPINATO, C.; PESSOA, A. Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00546, 2020.

LI, C.; CHEN, C.; WU, X.; TSANG, C-W.; MOU, J.; YAN, J.; LIU, Y.; LIN, C. S. K. Recent advancement in lignin biorefinery: With special focus on enzymatic degradation and valorization. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121898, 2019.

LIN, Z.; ZHOU, Y.; LIU, H.; ZHANG, J. Effect of multiple inhibitions in corncob hydrolysate on the lipid production by *Rhodotorula glutinis*. **Energy & Fuels**, v. 31, n. 11, p. 12247-12255, 2017.

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

MAMMAN, A. S.; LEE, J. M.; KIM, Y. C.; HWANG, I. T.; PARK, N. J.; HWANG, Y. K.; HWANG, J. S. Furfural: Hemicellulose/xyloseederived biochemical. **Biofuels**,

Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy, v. 2, n. 5, p. 438-454, 2008.

MARTINI, C. **Isolamento, Identificação e caracterização de linhagem de levedura quanto ao crescimento e fermentação utilizando meios sintéticos com pentoses e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2014. 121f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 2014.

MENEGOL, D.; FONTANA, R.C.; DILLON, A.J.P.; CAMASSOLA, M. Second-generation ethanol production from elephant grass at high total solids. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 280-290, 2016.

MICHELIN, M.; XIMENES, E.; DE MORAES, M. D. L. T.; LADISCH, M. R. Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 275-278, 2016.

MUÑOZ-PÁEZ, K. M.; ALVARADO-MICHI, E. L.; BUITRÓN, G.; VALDEZ-VAZQUEZ, I. Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation hydrogen production and microbial structure of a mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 4, p. 2289-2297, 2019.

NANDAL, P.; SHARMA, S.; ARORA, A. Bioprospecting non-conventional yeasts for ethanol production from rice straw hydrolysate and their inhibitor tolerance. **Renewable Energy**, v. 147, p. 1694-1703, 2020.

NAVARRETE, C.; MARTÍNEZ, J. L. Non-conventional yeasts as superior production platforms for sustainable fermentation-based bio-manufacturing processes. **Bioengineering**, v. 7, n. 4, p. 289-305, 2020.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2022.

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

PACHECO, T. F. Produção de etanol: primeira ou segunda geração?. **Embrapa Agroenergia-Circular Técnica** (INFOTECA-E), 2011.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000a.

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

PARK, Gwon Woo et al. Rice straw-derived lipid production by HMF/furfural-tolerant oleaginous yeast generated by adaptive laboratory evolution. **Bioresource Technology**, v. 367, p. 128220, 2023.

PIMENTA, L. B.; RODRIGUES, J. K. L. A.; SENA, M. D. D.; CORRÊA, A. L. A.; PEREIRA, R. L. G. A história e o processo da produção da cerveja: uma revisão. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 37, n. 3, p. 26715, 2020.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 447 f. 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, 2010.

RAJ, T.; CHANDRASEKHAR, K.; KUMAR, A. N.; BANU, R.; YOON, J-J.; BHATIA, S. K.; YANG, Y-H.; VARJANI, S.; KIM, S-H. Recent advances in commercial biorefineries for lignocellulosic ethanol production: Current status, challenges and future perspectives. **Bioresource technology**, v. 344, 2022.

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 330-340, 2017.

RIBEIRO, N. N. **Caracterização das condições fermentativas da levedura *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração**. 2019. 57 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal, 2019.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Edgard Blucher, 2001.

SCHNEIDER, C. F.; SCHULZ, D. G.; LIMA, P. R.; JÚNIOR, A. C. G. Formas de gestão e aplicação de resíduos da cana-de-açúcar visando redução de impactos

ambientais. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 5, 2012.

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

SITEPU, I.; SELBY, T.; LIN, T.; ZHU, S.; BOUNDY-MILLS, K. Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 7, p. 1061-1070, 2014.

SIVAGURUNATHAN, P.; RAJ, T.; MOHANTA, C. S.; SEMWAL, S.; SATLEWAL, A.; GUPTA, R. P.; PURI, S. K.; RAMAKUMAR, S. S. V.; KUMAR, R. 2G waste lignin to fuel and high value-added chemicals: Approaches, challenges and future outlook for sustainable development. **Chemosphere**, v. 268, 2021.

SJULANDER, N.; KIKAS, T. Origin, impact and control of lignocellulosic inhibitors in bioethanol production—A review. **Energies**, v. 13, n. 18, p. 4751, 2020.

STANMORE, B. R. Generation of energy from sugarcane bagasse by thermal treatment. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, p. 77-89, 2010.

VAJZOVIC, A.; BURA, R.; KOHLMEIER, K.; DOTY, S. L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 II: production of xylitol and ethanol in the presence of inhibitors. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 10, p. 1453-1463, 2012.

WANG, S.; SUN, X.; YUAN, Q. Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 258, p. 302-309, 2018.

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.

YU, Q.; ZHUANG, X.; HE, M.; ZHANG, Y.; YUAN, Z.; TAN, X. Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 592-598, 2013.

ZAMBERLAN, L. **Produção industrial de etanol de segunda geração: métodos de caracterização de biomassa e metabólitos ao longo do processo produtivo**. 2022. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo (Usp), Piracicaba, 2022.