

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E  
VETERINÁRIAS CAMPUS DE JABOTICABAL**

**LUCAS ANTOSZCZESZEN PIRONTI**

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR *Pichia membranifaciens* NA  
PRESENÇA DE INIBIDORES ISOLADOS OU EM ASSOCIAÇÃO**

**JABOTICABAL – SP  
2024**

LUCAS ANTOSZCZESZEN PIRONTI

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR *Pichia membranifaciens* NA  
PRESENÇA DE INIBIDORES ISOLADOS OU EM ASSOCIAÇÃO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

**JABOTICABAL - SP  
2024**

P672p

Pironti, Lucas Antoszczeszen

Produção de etanol de segunda geração por *Pichia membranifaciens* na presença de inibidores isolados ou em associação / Lucas Antoszczeszen Pironti. -- Jaboticabal, 2024

69 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton

1. Biocombustíveis. 2. Ácidos. 3. Associação de inibidores. 4. Leveduras não convencionais. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



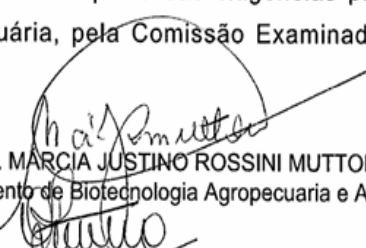
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PRODUÇÃO DE ETANOL 2G POR *Pichia membranifaciens* NA PRESENÇA DE INIBIDORES ISOLADOS OU EM COMBINAÇÃO

**AUTOR: LUCAS ANTOSZCZESZEN PIRONTI**

**ORIENTADORA: MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON**

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

  
Profa. Dra. MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON (Participação Presencial)  
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

  
Profa. Dra. OSANIA EMERENCIANO FERREIRA (Participação Presencial)  
Departamento de Agrária e Biológicas / Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) - Frutal/MG

  
Prof. Dr. LEONARDO LUCAS MADALENO (Participação Presencial)  
Faculdade de Tecnologia Nilo De Stéfani / Fatec - Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 06 de setembro de 2024

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**LUCAS ANTOSZCZESZEN PIRONTI** - Nasceu aos 31 de dezembro de 1997, no município de São Paulo, estado de São Paulo. Em fevereiro de 2015 ingressou no curso de Ciências Biológicas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Jaboticabal, recebendo o título de Bacharel em Ciências Biológicas em 30 de abril de 2021. Em 07 de março de 2022 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária em nível de Mestrado Acadêmico na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP,

Graduate Program in Agricultural and Livestock Microbiology, São Paulo State University(UNESP), School of Agricultural and Veterinary Sciences, Jaboticabal, SP, Brazil.

Aos meus pais, Sandra e Marcelo, que sempre me apoiaram incondicionalmente e sempre buscaram fazer o melhor.

Aos meus irmãos, Leonardo e Jordana, que eu sempre tive admiração e respeito.

A minha madrinha Alessandra e família, que sem eles isso seria apenas um sonho.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha grande família, por sempre me fazerem sentir incluído, amado e cuidado;

À prof. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, orientadora desta dissertação, pela confiança em meu trabalho, pelo acolhimento, por todo o conhecimento transferido, pela sabedoria, amizade e paciência;

Aos membros da banca examinadora pela participação e considerações;  
Ao Programa de Microbiologia Agropecuária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) pela oportunidade de realização do curso e aprimoramento profissional;

A todos os colegas, estagiários e funcionários da UNESP, desde a secretaria e direção do departamento até a pós-graduação. Em especial o Sérgio, técnico do laboratório, que foi um grande incentivador do meu progresso e ao Mateus, que foi meu colega tanto de laboratório como de apartamento.

Agradeço com meu coração em especial a Natália e Katia, ambas foram essenciais para a concretização desse trabalho, tanto intelectual quanto na hora de colocar a mão na massa, sem vocês este trabalho não seria possível;

Aos meus colegas da república Kilombo, que não só me deram uma nova casa, mas me deram uma nova família, obrigado pelo acolhimento imprescindível para meu crescimento como ser humano.

Agradeço ao Prof. Dr. Michel Brienzo e equipe pela parceria com o IPBEN, para as análises de cromatografia;

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

Muito obrigado!

*"A ciência atua na fronteira entre o conhecimento e a ignorância, sem medo de admitir que não sabemos. Não há nenhuma vergonha nisso. A única vergonha é fingir que temos todas as respostas."*

*(Neil de Grasse Tyson)*

## **PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR *Pichia membranifaciens* NA PRESENÇA DE INIBIDORES ISOLADOS OU EM ASSOCIAÇÃO- RESUMO**

O uso de biomassa vegetal para produção de etanol de segunda geração (2G) pode ser resposta a atual crise energética e demanda global de energia sustentável. Entretanto, um dos gargalos técnico para viabilizar esta produção é a hidrólise ácida da matéria-prima, os resíduos lignocelulósicos, pela possibilidade de produzir inibidores para os microrganismos fermentadores. A utilização de leveduras não convencionais, que apresentem tolerância a estes compostos tóxicos, pode ser uma alternativa promissora. Esta pesquisa objetivou determinar as doses máximas dos inibidores furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácido fênico, ácido levulínico e ácido fórmico, isolados e em associação, suportadas pela levedura *Pichia membranifaciens* (LJ04), assim como avaliar como estes compostos afetam a produção de biomassa e o rendimento de etanol. O estudo foi dividido em dois ensaios, ambos em meio sintético estéril composto por 45,0 g.L<sup>-1</sup> de xilose e 25,0 g.L<sup>-1</sup> de glicose, com suplementação de nutrientes e extrato de levedura. Foram avaliados parâmetros de cinética fermentativa (biomassa e velocidade de crescimento), concentrações de glicose, xilose, glicerol e etanol através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para o ensaio 1 o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (5x4x4+1) e (5x4x3+1) com 3 repetições, sendo os fatores inibidores (furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico, ácido fórmico e ácido levulínico), doses (0,0; 3,0; 3,5 e 4,0 g.L<sup>-1</sup>), e tempos (0, 6, 12 e 24 horas). Para o ensaio 2, utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com 8 tratamentos, 3 repetições, no qual as maiores doses de inibidores em associação suportadas pelas leveduras foram testadas. Os resultados obtidos indicam que: A cepa LJ04 da levedura *Pichia membranifaciens* tolerou concentrações dos inibidores furfural, HMF, ácidos fênico e levulínico, de forma isolada, ou em combinação nas doses de 3,0 a 3,5g.L<sup>-1</sup>; O ácido fórmico foi o inibidor que provocou maiores danos à fisiologia da levedura e produção de etanol, isolado ou em combinação, a partir de 3,0 g.L<sup>-1</sup>; O ácido fórmico influenciou negativamente a viabilidade celular, brotamentos e viabilidade de brotos, em todas as doses estudadas, levando a sobra de açúcares após 24 horas, que não foram metabolizados e baixos rendimentos do processo fermentativo e da produção de etanol; A LJ04 apresentou consumo de xilose, com tendência de maior transformação do açúcar na presença de ácido fênico e ácido levulínico; A produção e o rendimento de etanol foram maiores para os tratamentos com adição de ácido fênico.

**Palavras-chave:** Biocombustíveis; Ácidos; Associação de inibidores; Leveduras não convencionais.

## **SECOND-GENERATION ETHANOL PRODUCES BY *Pichia membranifaciens* IN THE PRESENCE OF ISOLATED OR COMBINED INHIBITORS - ABSTRACT**

A potential solution to the current energy problem and the need for sustainable energy worldwide is the production of second-generation (2G) ethanol from plant biomass. Acid hydrolysis is a major barrier for the 2G ethanol process because it generates fermentation inhibitors that harm microbes. It's critical to look for microbes that can withstand these substances. The LJ04 strain of the yeast *Pichia membranifaciens* was assessed in this study with the goals of determining resistance to high inhibitor dosages, xylose intake, and adequate fermentation efficiency and biomass output. The study was split into two assays, each conducted in a sterile synthetic medium supplemented with 45 g.L<sup>-1</sup> of xylose and 25 g.L<sup>-1</sup> of glucose and 45 g.L<sup>-1</sup> of xylose, supplemented with yeast extract and nitrogen, phosphorus, potassium, magnesium, manganese, and zinc. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to assess the amounts of glucose, xylose, glycerol, ethanol, and fermentation kinetic parameters (biomass and growth rate). In trial 1, the inhibitory factors (furfural, hydroxymethylfurfural, carbolic acid, formic acid, and levulinic acid), doses (0.0; 3.0; 3.5 and 4.0 g.L<sup>-1</sup>), and times (0, 6, 12, and 24 hours) were all subjected to a completely randomized factorial scheme (5x4x4+1) and (5x4x3+1) with three replicates. Trial 2 evaluated the greatest doses of inhibitors in combination supported by the yeasts using a completely randomized design with eight treatments and three replicates. According to the results, the LJ04 strain of the yeast *Pichia membranifaciens* was able to withstand concentrations of furfural, HMF, phenolic, and levulinic acids, either alone or in combination, at doses ranging from 3.0 to 3.5 g.L<sup>-1</sup>. The inhibitor that most severely damaged yeast physiology and ethanol production, either alone or in combination, starting at 3.0 g.L<sup>-1</sup> was formic acid. At all doses examined, formic acid had a detrimental effect on cell, budding, and shoot viability, resulting in excess sugars that were not metabolized after 24 hours and low fermentation and ethanol production yields; LJ04 showed xylose consumption, with a propensity for higher sugar transformation in the presence of phenolic acid and levulinic acid; Treatments that added carbolic acid produced and yielded more ethanol.

**Key words:** Biocombustibles; Acids; Association of Inhibitors; Non-Conventional Leveduras.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                   |  |
|-------------------|--|
| E1G               | Etanol de primeira geração                                     |
| E2G               | Etanol de segunda geração                                      |
| CAPES             | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior    |
| CLAE              | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                       |
| HPLC              | High-performance liquid chromatography                         |
| HMF               | Hidroximetilfurfural   |
| FUR               | Furfural   |
| AFE               | Ácido Fênico   |
| ALE               | Ácido Levulínico   |
| AFO               | Ácido Fórmico  |
| Y <sub>x</sub> /s | Rendimento de biomassa baseado no consumo de substrato         |
| Y <sub>P</sub> /s | Rendimento de produto (etanol) baseado no consumo de substrato |
| μ <sub>m</sub>    | Velocidade Específica Máxima de Crescimento                    |
| μ <sub>x</sub>    | Velocidade Específica de Crescimento                           |
| Q <sub>g</sub>    | Velocidade de Consumo de Glicose                               |
| Q <sub>x</sub>    | Velocidade de Consumo de Xilose                                |
| X <sub>0</sub>    | Biomassa inicial   |
| P                 | Concentração final de etanol                                   |
| P <sub>0</sub>    | Concentração inicial de etanol                                 |
| S                 | Concentração final do substrato                                |
| S <sub>0</sub>    | Concentração inicial do substrato                              |
| IPBEN             | Instituto de Pesquisa em Bioenergia                            |
| UNESP             | Universidade Estadual Paulista                                 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                     | <b>1</b>  |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>                          | <b>3</b>  |
| 2.1 Etanol no Brasil e no mundo                         | 3         |
| 2.2 Biomassas lignocelulósicas                          | 4         |
| 2.3 Hidrolisado e Inibidores fermentativos              | 5         |
| 2.4 Leveduras   | 7         |
| 2.5 Fermentação de pentoses                             | 8         |
| 2.6 Via metabólica de Xilose em fungos                  | 9         |
| 2.7 <i>Pichia membranifaciens</i>                       | 10        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>                            | <b>12</b> |
| 3.1 Local do experimento                                | 12        |
| 3.2 Delineamento experimental                           | 12        |
| 3.2.1 Ensaio 1 – Inibidores isolados                    | 12        |
| 3.2.2 Ensaio 2 – Inibidores em associação               | 12        |
| 3.3 Microrganismo e crescimento celular                 | 13        |
| 3.4 Preparo do mosto sintético                          | 14        |
| 3.5 Processo fermentativo                               | 14        |
| 3.6 Análises microbiológicas                            | 15        |
| 3.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência            | 16        |
| 3.8 Análise estatística                                 | 16        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                        | <b>17</b> |
| 4.1 Rendimento de biomassa Isolados                     | 17        |
| 4.2 Análises microbiológicas de inibidores isolados     | 23        |
| 4.3 Rendimento de biomassa em associação                | 27        |
| 4.4 Análises microbiológicas - inibidores em associação | 32        |
| 4.5 Efeito dos inibidores isolados no substrato         | 32        |
| 4.6 Efeito de inibidores em associação no substrato     | 39        |
| 4.7 Efeito de inibidores isolados nos produtos          | 41        |
| 4.8 Efeito dos inibidores em associação nos produtos    | 47        |
| <b>5. CONCLUSÕES</b>                                    | <b>52</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                       | <b>53</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Diante da atual crise energética, surge a necessidade de soluções para assegurar a demanda e a sustentabilidade global de energia. O uso de combustíveis fósseis representa em média 82% do consumo da energia primária mundial segundo o *Statistical Review of World Energy* (BP, 2022). A queima desses combustíveis resulta na emissão de gases de efeito estufa, como o dióxido de carbono, contribuindo significativamente para as mudanças climáticas de origem antropogênica.

No contexto brasileiro, observa-se que, para atender às demandas futuras de consumo de biocombustíveis, é imprescindível avançar na moagem de cana-de-açúcar, além da modernização e integração das produções de Etanol de Primeira Geração (E1G) e Etanol de Segunda Geração (E2G) nas usinas brasileiras. Proposto com forma de superar as limitações do E1G, o E2G utiliza de biomassa não alimentícia, como resíduos de madeira, palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar.

Dentre as alternativas promissoras para produção de biocombustíveis, destaca-se a reutilização dos resíduos vegetais lignocelulósicos, produzidos como sobras de culturas agrícolas. Neste caso, tem-se inúmeras vantagens, como a colaboração direta sobre a conservação do meio ambiente; abundância de matéria-prima em área já cultivada, praticamente sem custos; redução da necessidade de expansão da área para cultivo e redução das emissões de gases do efeito estufa.

Se comparado às alternativas de combustíveis fósseis e a outros biocombustíveis, o etanol 2G é significativamente mais limpo, reduzindo os efeitos negativos da produção de bioetanol em cerca de 85 e 90%, além do potencial da tecnologia para aumentar em cerca de 50% a produtividade atual, reduzindo a poluição do ar e do solo, além do uso estratégico da água e outros recursos (ANSANELLI et al., 2017; ARANTES, 2018).

Para a produção de etanol 2G, utiliza-se como matéria-prima a biomassa lignocelulósica, que é constituída por três polímeros distintos: a lignina, celulose e hemicelulose. A celulose é composta por polímero de glicose, que corresponde

de 20 a 60% das biomassas disponíveis. A hidrólise completa resulta em moléculas de glicose, sendo, atualmente, a fonte de açúcares fermentescíveis nas usinas de etanol celulósico.

A hemicelulose é molécula formada por hexoses, pentoses e outros açúcares. Após o processo de hidrólise, ocorre a produção, principalmente de glicose, frutose, arabinose e xilose. A xilose é açúcar que não é aproveitado por diversas leveduras comercialmente usadas hoje em dia nas indústrias.

Outro gargalo técnico para implementação do etanol de segunda geração (E2G), é o desenvolvimento de novas tecnologias, para quebra dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica. De modo geral, as etapas de pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos requerem a destoxificação do hidrolisado para remover os compostos tóxicos e/ou inibidores que são formados durante este processo. Este procedimento é trabalhoso e oneroso, e deve ser feito antes do processo fermentativo, aumentando os custos de produção.

Diversos microrganismos, como as leveduras, são suscetíveis a presença destes inibidores, produzidos sob diversas condições. Os efeitos provocados dependem das doses e do tipo de inibidores, assim como da estrutura química e dos métodos de extração. Razão pela qual tem sido bastante estudados.

O gênero *Pichia* é conhecido por possuir espécies que suportam altas doses de inibidores do processo fermentativo. A *Pichia membranifaciens* é levedura encontrada na natureza em alimentos e bebidas de fermentação natural e em estado de degradação, que tem habilidade para metabolizar a xilose em etanol, assim como a capacidade para metabolizar etanol, quando há o esgotamento dos açúcares no substrato.

Neste contexto, esta pesquisa objetiva determinar as doses máximas dos inibidores furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácido fênico, ácido levulínico e ácido fórmico, isolados e em associação, suportadas pela levedura *Pichia membranifaciens* (LJ04), assim como avaliar como estes compostos podem afetar a produção de biomassa e o rendimento de etanol.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Etanol no Brasil e no mundo

O etanol pode ser usado como ferramenta para diminuir os impactos climáticos dos combustíveis fósseis. Por ser fonte renovável de energia, essa tecnologia contribui com a menor emissão de dióxido de carbono na atmosfera.

Neste sentido, a Política Nacional de Biocombustíveis, Renovabio, foi sancionada pelo governo brasileiro em 2017, definiu o papel estratégico dos biocombustíveis, especialmente no que se trata à segurança energética e à diminuição de emissões de gases causadores do efeito estufa, de maneira a garantir a expansão sustentável do mercado de biocombustíveis no país. Até 2030, a matriz energética deve ser constituída por 45% de energias renováveis, com metas de aumento na produção de etanol 1G para cerca de 50 bilhões de litros e 2,5 bilhões de litros de etanol 2G (CONAB, 2019).

Novas tecnologias, como os biocombustíveis, podem ser ferramentas importantes para geração de energia mais sustentável. O etanol de 2G, mesmo com limitações, será imprescindível para cumprir as metas estabelecidas de desenvolvimento sustentável no Brasil. A matriz energética do país, que em grande parte é oriunda de fontes renováveis, contrasta com o resto do mundo, que apresenta participação menor de fontes renováveis (BEN, 2022). Para aumentar a produção de biocombustíveis existem duas rotas possíveis, aumentar a produtividade no campo com a cana-de-açúcar, ou promover o aperfeiçoamento de tecnologias do etanol lignocelulósico, a partir da conversão da celulose e hemicelulose em etanol (FARINAS, 2021).

O bioetanol é um produto muito importante na economia brasileira, sendo utilizado em veículos flex-fuel, que são movidos a etanol hidratado, além de ser empregado também em mistura com a gasolina, na forma anidra, contribuindo para aumentar a octanagem dos combustíveis, além de diminuir a emissão de poluentes. Pode ser ainda ser também utilizado na fabricação de diversos produtos como tintas, vernizes e solventes (CONAB, 2019).

A safra 2023/2024 registrou a produção de 713,2 milhões de litros de etanol, representando crescimento de área de cerca de 0,5 %, com um aumento

de 16,2% do rendimento médio de 73,655 quilos por hectare para 85,580 kg/ha. (CONAB, 2024).

O etanol é produzido através da conversão da sacarose por leveduras em produtos através da fermentação. Em resumo, o processo consiste em: (1) converter biomassa em açúcares fermentescíveis; (2) fermentação açúcares através de leveduras em etanol; (3) separação e purificação do etanol. Isso ocorre em meio com elevada concentração de água que por meio da destilação é removida obtendo-se uma mistura com cerca de 95% de etanol puro, o qual é denominado de etanol hidratado. Com a remoção da água residual no produto é obtido então o etanol anidro, o que torna possível a adição à gasolina (ZUURBIER; VOOREN, 2008).

O Etanol 2G é produzido a partir da biomassa lignocelulósica, composta por polímeros de hemicelulose e celulose, nas estruturas formadas por açúcares que podem ser fermentados. Estes polímeros são estruturais, e apresentam trama rígida. O primeiro passo é disponibilizar esses açúcares através da hidrólise ácida, que é realizada em altas temperaturas, obtendo-se hidrolisado (ARANTES, 2018).

Esse hidrolisado então é diluído e tratado para passar pelo processo de fermentação, contendo, principalmente, glicose e xilose, que é convertido através de microrganismos em etanol, que depois passa pelos mesmos processos do E1G. No caso do etanol 2G, a tecnologia tem o potencial aumentar em cerca de 50% a produtividade atual (ARANTES, 2018). Existe grande gama de resíduos vegetais oriundos da agroindústria passíveis a produção de etanol oriundo de biomassa lignocelulósica, por exemplo, bagaço, palha, cascas, caules, pedúnculos e folhas (HOSKINS; LYONS, 2009).

## **2.2 Biomassas lignocelulósicas**

As biomassas lignocelulósicas, compostas principalmente pelos polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, possuem abundância de açúcares fermentescíveis, além apresentarem cinzas, pectina, extrativos e gorduras (BALAT, 2011; KOPPRAM et al., 2014).

A celulose é polímero linear composto por moléculas de D-glicose ligadas

por ligações do tipo  $\beta$ -1,4. A hemicelulose é polímero ramificado composto por diversos tipos de moléculas. Dentre essas pentoses como D-xilose e L-arabinose; e hexoses como D-glicose, D-manose e D-galactose. A lignina é polímero mono cristalino com *p*-coumaryl, conifenil e álcool sinapil como unidades de construção na biomassa (RUDOLF et al., 2008; TOMAS-PEJO et al., 2014).

Portanto, essa biomassa pode ser utilizada para produzir uma gama de produtos químicos, em especial o etanol, que é um dos produtos mais bem estudados e com processos definidos de produção em escala industrial, principalmente, quando se emprega a celulose. (KOPPRAM et al., 2014). Como nem toda biomassa lignocelulósica é composta pela mesma proporção desses polímeros, essa matéria-prima pode obter diferentes rendimentos, que depende da procedência e características específicas de cada biomassa, uma vez que as proporções entre celulose, hemicelulose e lignina depende das variedades empregadas (BALAT, 2011).

O bagaço de cana-de-açúcar é um recurso abundante sendo excelente matéria-prima para produção de etanol, a partir do tratamento de suas frações lignocelulósicas (ALVIM e HOPPE, 2016). Além da glicose presente na celulose, o bagaço de cana-de-açúcar é rico em xilanas, produzindo quantidades relativamente altas de xilose através da hidrólise ácida. O microrganismo que realiza a conversão desses açúcares em etanol deve ser capaz de metabolizar xilose, que é açúcar de cinco carbonos, de forma eficiente (RUDOLF et al., 2008). A literatura relata diversos microrganismos que são capazes de metabolizar a pentose.

### **2.3 Hidrolisado e Inibidores fermentativos**

O grande problema da implementação do etanol de segunda geração no contexto atual, é a necessidade de desenvolvimento de novas técnicas industriais, principalmente para quebra dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica (CANDIDO et al., 2019). Neste contexto, técnicas de pré-tratamento vêm sendo desenvolvidas, as quais podem ser realizadas através de métodos químicos, físicos, biológicos e/ou físico-químicos. O processo químico

de hidrólise ácida, é uma das técnicas conhecidas, que emprega ácidos para realizar a disponibilização dos açúcares (CHANDEL et al., 2007)

Dentre os mais utilizados, o ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), clorídrico (HCl), fosfórico ( $H_3PO_4$ ) e nítrico ( $HNO_3$ ) têm sido alvo de estudos graças a quantidade de açúcares que podem gerar, uma vez que existem variações no modo de ação de cada tipo de ácido. Entretanto, este modelo de pré-tratamento pode levar à formação de compostos residuais tóxicos que causam danos ao metabolismo dos microrganismos, afetando a metabolização dos açúcares fermentescíveis, além da viabilidade econômica de cada produto (CAMBI et al., 2017).

Cada ácido produz quantidades diferentes de açúcares fermentescíveis ao mesmo tempo gerando diferentes compostos residuais tóxicos, os quais podem causar danos ao metabolismo do agente fermentador. Esses compostos residuais são divididos em três grupos principais: ácidos fracos, compostos fenólicos e derivados de furano (COLOMBI; ZANONI; TAVARES, 2018).

O ácido acético, assim como outros ácidos fracos, reduz o crescimento microbiano. De modo semelhante, compostos fenólicos, influenciam diretamente na função biológica de barreira seletiva e matriz enzimática, deteriorando integridade da membrana celular da levedura (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT (2013); COLOMBI; ZANONI; TAVARES (2018).

Estas reações de hidrólise também podem ser gerados compostos derivados de furanos, como o furfural e o hidroximetilfurfural, os quais em altas concentrações, podem provocar danos a moléculas de DNA, interromper a síntese de proteínas e RNA, além de inibir o crescimento biológico. Outros compostos que devem ser considerados são o ácido fórmico e ácido levulínico, que são inibidores conhecidos por terem efeitos significativos sobre o crescimento celular, afetando severamente a fisiologia de microrganismos (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; WANG et al., 2016; ASTUTI et al. 2018).

Estudos relatados na literatura indicam a possibilidade de cepas de diferentes espécies de leveduras de metabolizarem alguns ácidos e compostos fenólicos, atuando como agentes destoxificantes.

## 2.4 Leveduras

Sendo organismos encontrados em todo planeta, podendo ser unicelulares ou pluricelulares. Os fungos são formas de vidas versáteis, podendo ser encontrados desde em resíduos e matérias em decomposição, até em outros organismos, como plantas e animais (FUKUMOTO et al., 2017). De acordo com a literatura, apenas no Brasil são descritas cerca de 5.719 espécies de fungos, distribuídas em 1.246 gêneros, 102 ordens e 13 divisões (MAIA et al., 2015).

Uma parcela muito pequena dos fungos pode estar associada a doenças de plantas, como por exemplo *Fusarium* sp., *Sclerotium* sp., *Verticillium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp, dentre outros, ou dos homens, como *Candida* , *Aspergillus*, *Cryptococcus* e *Pneumocystis*. Entretanto, são considerados essenciais para manutenção do ciclo da vida, além de muitos deles serem usados em ambientes industriais, desde produção alimentos até na indústria de produtos químicos e fármacos, com alto potencial biotecnológico (FUKUMOTO et al., 2017).

As leveduras são fungos unicelulares, podendo ser classificadas no filo ascomicetos e basidiomicetos. Podem apresentar multiplicação sexuada, através de brotação ou fissão binária, sem formação corpos de frutificação, ou assexuada (KURTZMAN et al., 2011). Por serem organismos eucariontes, são importantes por terem aparato fisiológico que possibilita sua utilização em biotecnologia, assim como microrganismos industriais, apresentando capacidade de produção em maior escala, de proteínas mais complexas que os organismos procariontes (KURTZMAN et al., 2011).

Os efeitos de inibidores derivados da hidrólise da biomassa lignocelulósica em leveduras depende da estrutura química dos compostos estudados e doses utilizadas, em (RUMBOLD et al. 2009; YANG et al. 2018) e de forma menos extensiva em outras espécies, como *Zygosaccharomyces*, *Spathaspora passalidarum*, *Candida* spp (COTTIER et al. 2015; MORENO et al. 2019) e outros (YAMAKAWA et al. 2020).

## 2.5 Fermentação de pentoses

Atualmente, o uso de microrganismos na geração de novas fontes de energia tem sido importante, principalmente na área da transição verde. Algumas espécies têm sido estudadas para produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (JOHNSON E ECHAVARRI-ERASUN, 2011).

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante em massa em diferentes biomassas. Constituídas por diferentes moléculas, como as pentoses D-xilose e L-arabinose (KOPPRAM et al., 2014). A D-xilose é o segundo açúcar mais abundante nos materiais lignocelulósicos, durante o pré-tratamento, enquanto a glicose o açúcar disponibilizado em maiores concentrações no processo de hidrólise (DUSSÁN et al., 2016).

A levedura mais comumente empregada para processos fermentativos, a *Saccharomyces cerevisiae*, apesar de consumir de forma eficiente os açúcares de seis carbonos presentes nas diferentes matérias-primas, não é capaz de realizar a metabolização dos açúcares de cinco carbonos presente na biomassa lignocelulósica. Não apresenta habilidades para realizar a fermentação de todos os açúcares presentes no hidrolisado, em especial as pentoses, produzidas a partir da quebra da hemicelulose (KOPPRAM et al., 2014). Assim, para que haja o aproveitamento da fração hemicelulósica, microrganismos com capacidade de metabolizar açúcares de cinco carbonos, principalmente a xilose, devem ser identificados e estudados para não excelentes opções possibilitando a produção do E2G.

Neste contexto, há grande interesse e demanda por novas leveduras com habilidade de aproveitar as pentoses, viabilizando a produção do etanol celulósico, proporcionando maiores rendimentos de biocombustível, na área cultivada. Verifica-se também aumento de descrição de espécies fermentadoras de pentoses (VARIZE et al., 2018). Há que se considerar ainda que pequena parcela das leveduras capazes de metabolizar xilose, cerca de 1%, também são capazes de produzir etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007).

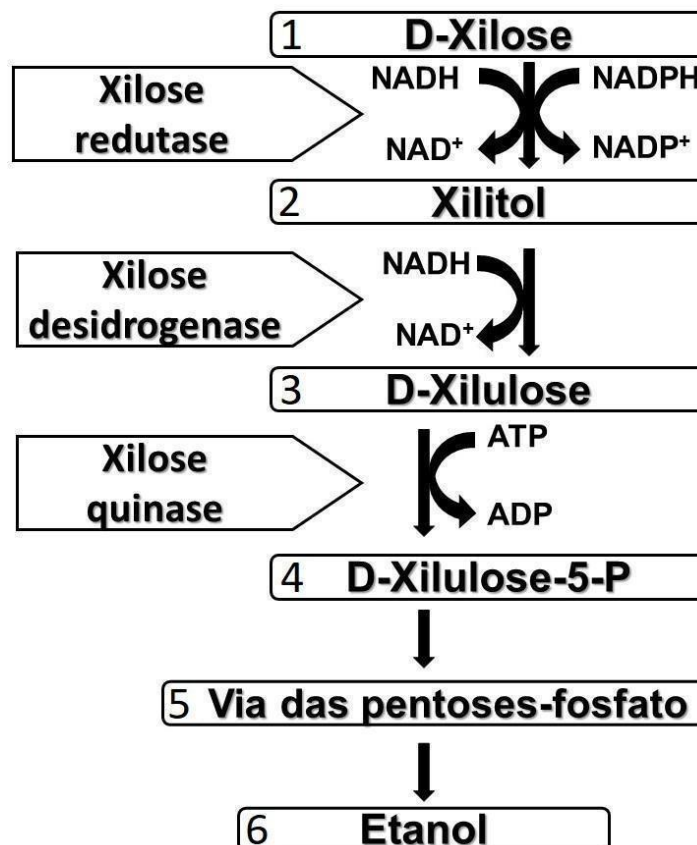
Um fator determinante para obtenção da produção de etanol eficiente é a escolha da linhagem de levedura que realizará o processo fermentativo. Os gêneros de leveduras que fermentam xilose diretamente são: *Pichia*, *Candida*,

*Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Clavispora* e *Pachysolen* (McMILLAN, 1993). Também há registros de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de metabolizar o açúcar de cinco carbonos, gerando acúmulo de xilitol.

## 2.6 Via metabólica de Xilose em fungos

A produção de E2G que seja viável economicamente, depende da eficiente metabolização de pentoses em álcool etílico. A xilose é o segundo açúcar mais abundante encontrado em biomassas lignocelulósicas (MACRELLI et al. 2014). A via metabólica de D-xilose em fungos segundo Hahn-Hägerdal et al. (2007) e Matsushika et al. (2009) pode ser resumida através da Figura 01.

**Figura 01** – Resumo da via metabólica para produção de etanol, por fungos, a partir de D-xilose.



Fonte: Adaptado de Matsushika et al., (2009).

Os passos descritos na Figura 01, indicam que para a produção do etanol a partir de xilose, é necessária a redução da D-xilose em xilitol através da enzima xilose redutase. A seguir, ocorre a oxidação de xilitol em D-xilulose pela ação da enzima xilitol desidrogenase, seguida da Fosforilação de D-xilulose pela ação da enzima xilulose quinase formando D-xilulose-5-P que então é metabolizada pela via das pentoses fosfatos, obtendo-se ao final a produção de etanol.

Poucos microrganismos possuem essa rota metabólica de conversão de Xilose em etanol, a levedura *Pichia membranifaciens* LJ04 além de ser capaz da metabolização da pentose, também produz etanol com rendimentos relativamente altos, como descrito por Ribeiro (2019).

## **2.7 *Pichia membranifaciens***

Leveduras do gênero *Pichia* são comumente encontradas em ambientes naturais e como contaminantes em diversos alimentos, bebidas e produtos com alto teor de açúcar. Certas espécies são capazes de consumir os ácidos orgânicos presentes em conservas, resultando em problemas de deterioração desses alimentos (GAVA et al., 2008). Desde que E. C. Hansen descreveu o gênero *Pichia* em 1904, a definição deste táxon passou por mudanças significativas para incluir um número crescente de novas espécies que foram atribuídas a ele. Antes, era considerado um dos maiores gêneros, com 91 espécies relacionadas. (KURTZMAN, 1998).

A *P. membranifaciens* é a espécie-tipo do gênero *Pichia* usada para definir o clado. Características peculiares dessa levedura, como pequenas diferenças no fenótipo, formação de ascósporos que podem variar em forma e assimilação de poucas fontes de carbono utilizadas para identificação de leveduras, levaram a descrições errôneas de novas espécies de microrganismos (KURTZMAN, 2011). Em 2009, Kurtzman e colaboradores realizaram análise multigênica para compreender as relações entre as espécies de *Pichia* e seus anamorfos, e então o gênero foi reduzido para apenas 20 espécies, excluindo aquelas relacionadas ao táxon *Candida*.

*Pichia membranifaciens* é levedura amplamente distribuída na natureza, considerada microrganismo de degradação de alimentos e bebidas, sendo

encontrada em materiais vegetais, frutas estragadas e bebidas fermentadas (KURTZMAN, 2011). Descrita como possível agente de controle biológico de doenças de pós-colheita de diversas frutas (WANG et al., 2013; ZHOU et al., 2014; GRAMISCIÀ et al., 2018) e identificada como parte da microbiota de processos de fermentação espontânea para produção de licores destilados na China (WU et al., 2013; YOU et al., 2016), produção de vinhos (ŠURANSKÁ et al., 2012; STEFANINI et al., 2016) e fermentação de azeitonas pretas (PEREIRA et al., 2015; GROUNTA et al., 2016) e verdes (BENÍTEZ-CABELLO et al., 2015). Entretanto sua capacidade de fermentação alcoólica é pouco explorada e descrita na literatura.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local do experimento**

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Álcool e Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo.

#### **3.2 Delineamento experimental**

##### **3.2.1 Ensaio 1 – Inibidores isolados**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial  $(5 \times 4 \times 4 + 1)$  e  $(5 \times 4 \times 3 + 1)$  com 3 repetições, sendo os fatores os Inibidores (furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico, ácido fórmico e ácido levulínico), as doses (0, 3, 3,5 e 4,0 g.L<sup>-1</sup>), e os tempos (0, 6, 12 e 24 horas), sendo que para etanol e glicerol os tempos foram (6, 12 e 24 horas). As dosagens foram estabelecidas de acordo com estudos anteriores (CHANDEL et al., 2007; RUYTERS et al., 2015; DÍAZ-NAVA, 2017)

##### **3.2.2 Ensaio 2 – Inibidores em associação**

Foram utilizados delineamento experimental inteiramente casualizado com 08 tratamentos, com 3 repetições, no qual as maiores doses de inibidores em associação suportadas pelas leveduras foram testadas. Neste planejamento, os inibidores estavam presentes nos meios de fermentação e a associação entre os mesmos foi avaliada. A tabela a seguir traz as condições operacionais estudadas (Tabela 01).

**Tabela 01** - Doses de inibidores testadas nos Tratamentos estudados

| Tratamentos | Furfural | Hidroximetilfurfural | Ácido fênico | Ácido levulínico | Ácido fórmico |
|-------------|----------|----------------------|--------------|------------------|---------------|
| 1           | (+1)     | (-1)                 | (+1)         | (-1)             | (+1)          |
| 2           | (-1)     | (+1)                 | (-1)         | (-1)             | (+1)          |
| 3           | (-1)     | (-1)                 | (+1)         | (+1)             | (-1)          |
| 4           | (-1)     | (+1)                 | (+1)         | (-1)             | (-1)          |
| 5           | (+1)     | (-1)                 | (-1)         | (-1)             | (-1)          |
| 6           | (+1)     | (+1)                 | (-1)         | (+1)             | (-1)          |
| 7           | (+1)     | (+1)                 | (+1)         | (+1)             | (+1)          |
| 8           | (-1)     | (-1)                 | (-1)         | (+1)             | (+1)          |

(+1) = maior dose suportada pelas leveduras de 1,0 g.L<sup>-1</sup>.

(-1) = segunda maior dose suportada pelas leveduras 0,6 g.L<sup>-1</sup>.

**Fonte:** autoria própria.

### 3.3 Microrganismo e crescimento celular

A levedura utilizada foi *Pichia membranifaciens* LJ04, a qual pertence ao banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia das Fermentações. Para garantir o crescimento celular de cultura pura (livre de microrganismos contaminantes), a levedura foi inicialmente inoculada pelo método de semeadura por estrias em placas de Petri contendo o meio YPXD (*Yeast Extract-Peptone-Xylose-Dextrose*) sólido, o qual é formado por 20 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 10 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 10 g.L<sup>-1</sup> de xilose e 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar microbiológico (GOVINDASWAMY e VANE, 2007).

Em trabalhos anteriores de Ribeiro (2019), o teste do crescimento foi realizado para determinar o mosto ideal para o crescimento segundo Govindaswamy e Vane (2007). O meio utilizado então foi YPXD (*Yeast Extract-Peptone-Xylose-Dextrose*) contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 10 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 10 g.L<sup>-1</sup> de xilose.

Para atingir a concentração celular de 10<sup>8</sup> células.mL<sup>-1</sup>, placas consideradas puras foram inoculadas em erlenmeyers esterilizados contendo 200 mL de meio, então os frascos foram incubados a 32°C por 72 horas sob

agitação orbital (125 rpm). Ao fim do período de crescimento, o meio de cultura foi transferido para os recipientes da centrífuga esterilizados, para serem centrifugados a fim de separar a parte líquida, que foi descartada, e a parte sólida, que contém as leveduras as quais foram suspensas em solução salina de NaCl a 0,85% e armazenadas a 4°C. O processo foi repetido, até atingir a massa necessária.

### 3.4 Preparo do mosto sintético

Para realização dos ensaios os inibidores foram diluídos em solução 45 g.L<sup>-1</sup> de xilose e 25 g.L<sup>-1</sup> de glicose em água destilada de modo a preparar o mosto sintético que foi utilizado no processo fermentativo. A suplementação com nutrientes, foi realizada com a adição de sulfato de amônio, fosfato de sódio, sulfato de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de zinco. Os reagentes foram adicionados para obtenção de 0,3g.L<sup>-1</sup> de Nitrogênio, 0,3g.L<sup>-1</sup> de Fósforo, 0,3g.L<sup>-1</sup> de Potássio, 0,05g.L<sup>-1</sup> de Magnésio, 0,01g.L<sup>-1</sup> de Manganês, 0,01g.L<sup>-1</sup> de Zinco, teores essenciais para realização da fermentação (PAVANI et al., 2013) e extrato de levedura (SILVA, 2019).

Usando a solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, o pH do meio foi adequado para 3,5, sendo este o valor ideal para a fermentação da levedura *P. membranifaciens* LJ04 (RIBEIRO et al, 2019).

### 3.5 Processo fermentativo

As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyer de 500mL, sendo estes mantidos em mesa agitadora com controle de temperatura a 37°C e rotação de 150 rpm. Durante o desenvolvimento do processo fermentativo foram avaliados também os seguintes parâmetros: viabilidade celular, brotamento e viabilidade dos brotos (LEE; ROBINSON; WANG, 1981).

Alíquotas foram coletadas de cada repetição nos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas para a realização das análises microbiológicas e posterior análise em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HERNÁNDEZ-PÉREZ; DE ARRUDA; FELIPE, 2016).

O processo fermentativo foi dividido em dois ensaios, sendo o Ensaio 1

para definir os efeitos dos inibidores isolados no desempenho de *P. membranifaciens* LJ04 e o Ensaio 2 contendo os inibidores em associação em diferentes concentrações, conforme descrito nos itens **3.2.1** e **3.2.2**.

### 3.6 Análises microbiológicas

Durante o experimento foram recolhidas alíquotas para análises microbiológicas, verificando-se a viabilidade celular, o índice de brotamento e a viabilidade de brotos nos intervalos de tempo de 0 horas (início da fermentação) e 24 horas (término da fermentação). Esta etapa foi realizada com o auxílio de câmara de Neubauer (LEE; ROBINSON; WANG, 1981). Em seguida, foram realizados os cálculos para determinar a porcentagem de cada parâmetro estudado segundo a figura abaixo:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Células vivas} \times 100}{\text{Células vivas} + \text{Células mortas}}$$

$$\text{Índice de brotamento (\%)} = \frac{\text{Brotos vivos} \times 100}{\text{Células vivas} + \text{Células mortas}}$$

$$\text{Viabilidade dos brotos (\%)} = \frac{\text{Brotos vivos} \times 100}{\text{Brotos vivos} + \text{Células mortas}}$$

As análises da cinética fermentativa foram conduzidas de acordo com a metodologia empregada por Schmidell et al. (2001).

Inicialmente, determinou-se a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_m$ ), a qual é constante e máxima na fase exponencial. Este parâmetro foi calculado a partir da plotagem da curva de  $\ln(x)$  versus tempo de cultivo (em horas) na fase exponencial, resultando em reta com coeficiente angular igual à velocidade específica máxima de crescimento. A velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) da fase exponencial foi determinada pelo método geométrico da equação 1:

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

Onde:

- I.  $\mu_x$ : Velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ );
- II. X: Biomassa ou massa celular ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- III. t: Tempo (h);

Os fatores de rendimento determinados foram as conversões de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ):

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

Onde:

- I.  $Y_{X/S}$ : Rendimento de biomassa baseado no consumo de substrato ( $\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{substrato}}$ );
- II.  $Y_{P/S}$ : Rendimento de etanol com base no consumo de substrato ( $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$ );
- III. X: Biomassa final ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- IV.  $X_0$ : Biomassa inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- V. P: Concentração final de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- VI.  $P_0$ : Concentração inicial de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- VII. S: Concentração final do substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- VIII.  $S_0$ : concentração inicial do substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

### 3.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Alíquotas dos mostos retiradas durante o processo fermentativo foram então submetidas à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC), graças à colaboração com IPBEN (Instituto de Pesquisa em Bioenergia) da UNESP Campus Rio Claro, foram determinadas as concentrações de glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol (HERNÁNDEZ-PÉREZ; DE ARRUDA; FELIPE, 2016).

### 3.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram então submetidos à análise de variância pelo Teste F, comparação de médias pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), e quando necessário foi a técnica de análise de regressão polinomial foi aplicada. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Programa AgroESTAT - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos (BARBOSA e MALDONADO JÚNIOR, 2015).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Rendimento de biomassa Isolados

Os resultados obtidos para Rendimento de Biomassa, estão apresentados na Tabela 02. Da sua análise verificou-se que o tratamento com o furano HMF apresentou valores menores que o controle, especialmente a dose de 3,5 g.L<sup>-1</sup>, que resultou em um terço da velocidade máxima específica de crescimento. Os tratamentos com a menor taxa máxima de crescimento foram HMF e ácido fórmico, com valores próximos a um terço do controle.

**Tabela 02** - Resultados obtidos para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de Furfural, Hidroximetilfurfural (HMF), Ácido Fênico, Ácido Levulínico e Ácido Fórmico avaliando os parâmetros: Velocidade Específica Máxima de Crescimento ( $\mu_m$ ), Velocidade Específica de Crescimento ( $\mu_x$ ); Biomassa final subtraído da biomassa inicial ( $X - X_0$ ); Velocidade de Consumo de Glicose ( $Q_g$ ) e Velocidade de Consumo de Xilose ( $Q_x$ )

| Inibidores       | Doses (g.L <sup>-1</sup> ) | $\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )* | $\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )* | $X - X_0$ (g.L <sup>-1</sup> )** | $Q_g$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) <sup>A</sup> | $Q_x$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) <sup>B</sup> |
|------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--|--|
| Controle         | 0,0                        | 0,003 ±0,001                | 0,040 ±0,018                | 0,116 ±0,038                     | 0,810  | 0,241  |
| Furfural         | 3,0                        | 0,005 ±0,001                | 0,054 ±0,012                | 0,157 ±0,024                     | 0,896  | 0,492  |
|                  | 3,5                        | 0,002 ±0,001                | 0,023 ±0,010                | 0,067 ±0,023                     | 0,812  | 0,308  |
|                  | 4,0                        | 0,002 ±0,001                | 0,029 ±0,007                | 0,085 ±0,014                     | 0,804  | 0,266  |
| HMF              | 3,0                        | 0,002 ±0,002                | 0,029 ±0,015                | 0,083 ±0,031                     | 0,886  | 0,461  |
|                  | 3,5                        | 0,001 ±0,001                | 0,020 ±0,002                | 0,059 ±0,004                     | 1,101  | 0,537  |
|                  | 4,0                        | 0,002 ±0,001                | 0,026 ±0,009                | 0,081 ±0,022                     | 0,896  | 0,436  |
| Ácido Fênico     | 3,0                        | 0,003 ±0,001                | 0,038 ±0,014                | 0,110 ±0,029                     | 0,847  | 0,568  |
|                  | 3,5                        | 0,003 ±0,002                | 0,035 ±0,014                | 0,101 ±0,030                     | 0,711  | 0,084  |
|                  | 4,0                        | 0,002 ±0,002                | 0,026 ±0,018                | 0,077 ±0,035                     | 0,716  | 0,227  |
| Ácido Levulínico | 3,0                        | 0,002 ±0,001                | 0,022 ±0,008                | 0,064 ±0,017                     | 0,730  | 0,173  |
|                  | 3,5                        | 0,002 ±0,001                | 0,024 ±0,011                | 0,071 ±0,025                     | 0,638  | 0,107  |
|                  | 4,0                        | 0,003 ±0,001                | 0,033 ±0,003                | 0,096 ±0,007                     | 0,821  | 0,410  |
| Ácido Fórmico    | 3,0                        | 0,001 ±0,001                | 0,017 ±0,007                | 0,049 ±0,015                     | 0,246  | 0,160  |
|                  | 3,5                        | 0,001 ±0,001                | 0,020 ±0,003                | 0,057 ±0,007                     | 0,182  | 0,165  |
|                  | 4,0                        | 0,002 ±0,001                | 0,026 ±0,006                | 0,075 ±0,014                     | 0,218  | 0,221  |

\* Intervalo de tempo usado para determinação de  $\mu_m$  e  $\mu_x$ : 0-12h

\*\*Diferença entre os valores de biomassa em 24h (X) e 0h (X<sub>0</sub>) de incubação

A (Glicose inicial - Glicose final)/24h

B (Xilose inicial - Xilose final)/24h

Fonte: autoria própria.

Em relação à velocidade específica de crescimento, apenas o tratamento com furfural na concentração de 3 g.L<sup>-1</sup> apresentou maior valor em relação ao controle, porém, para as doses mais altas, observou-se redução do crescimento. O tratamento com ácido fênico foi o mais próximo do controle, porém, ao

aumentar a dose para 4 g.L<sup>-1</sup>, o valor caiu em 66%. O ácido fórmico foi o tratamento que promoveu maior restrição de crescimento. De acordo com Ingraham e Guymon (1960), concentrações elevadas deste ácido promovem a inibição no metabolismo da leucina, afetando a fisiologia da levedura.

Os resultados do aumento da dose nas velocidades específicas ( $\mu_x$  e  $\mu_m$ ) e na diferença entre biomassa inicial e final ( $X - X_0$ ) mostram basicamente três padrões. O inibidor HMF apresenta valores inferiores ao controle sem tendência definida. Os tratamentos com furfural e o ácido fênico demonstram diminuição do crescimento com o aumento da dose, enquanto o ácido levulínico e o ácido fórmico mostram um maior crescimento com o aumento das doses, alcançando os maiores valores na dose de 4 g.L<sup>-1</sup>. O tratamento com furfural, na dose de 3 g.L<sup>-1</sup> foi o único que superou o controle, com um aumento de até 66% nos parâmetros analisados, enquanto os outros tratamentos indicaram uma menor taxa de crescimento e produção de biomassa na presença dos inibidores.

O tratamento com a presença de HMF, com destaque a dose 3,5 g.L<sup>-1</sup> do HMF, que obteve a maior velocidade de consumo encontrada, 35% maior que o controle, apresentando em todas doses uma maior velocidade consumo do açúcar. Já o furfural teve uma redução da velocidade de consumo com o aumento da concentração de inibidor. A dose de 4 g.L<sup>-1</sup> foi a única dos derivados de furanos que apresentou uma velocidade menor que o controle.

Por outro lado, os tratamentos ácidos apresentaram média inferior ao controle, com redução de aproximadamente 6,5% para o ácido fênico, 10% para o ácido levulínico e quase 75% para o ácido fórmico. Apenas os tratamentos com furfural e ácido fênico demonstraram clara tendência de menor consumo de açúcar à medida que aumentava a concentração dos inibidores.

Na Tabela 03, verifica-se que o rendimento de biomassa para os tratamentos no geral apresentaram valores inferiores ou iguais ao controle, a não ser para o furfural na dose de 3,0 g.L<sup>-1</sup>, em que os valores de rendimento de biomassa dobraram nos tempos de 6 e 12 horas se comparado ao controle e em 24 horas, observou-se aumento de 38%. Furfural e ácido fênico apresentaram a mesma tendência de menor rendimento de biomassa com o aumento da dose.

Ao contrário do ácido fórmico e ácido levulínico, no qual o aumento da dose é acompanhado de maiores rendimentos de biomassa. Os menores valores obtidos para o parâmetro foram em todas as doses do ácido fórmico e para a dose de 3,5 g.L<sup>-1</sup> de HMF.

Verifica-se que esse resultado é concordante em relação aos dados apresentados na Tabela 02. , mas no caso o ácido fórmico acaba demonstrando valores menores, justamente por ser o tratamento onde foi encontrado glicose residual ao final da fermentação, ou seja, o inibidor teve efeito suficiente na fisiologia da levedura que a mesma não foi capaz de metabolizar os açúcares presentes no meio, portanto o menor rendimento de biomassa era esperado.

**Tabela 03** - Resultados médios e desvio padrão obtidos para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de Furfural, Hidroximetilfurfural (HMF), Ácido Fênico, Ácido Levulínico e Ácido Fórmico isolados para rendimento de biomassa baseado no consumo de substrato (Yx/s)

| Doses (g.L <sup>-1</sup> ) | Tempo | Yx/s* (g.g <sup>-1</sup> ) |              |              |                  |               |
|----------------------------|-------|----------------------------|--------------|--------------|------------------|---------------|
|                            |       | Furfural                   | HMF          | Ácido fênico | Ácido levulínico | Ácido fórmico |
| Controle                   | 6h    | 0,021 ±0,010               | 0,021 ±0,010 | 0,021 ±0,010 | 0,021 ±0,010     | 0,021 ±0,010  |
|                            | 12h   | 0,024 ±0,010               | 0,024 ±0,010 | 0,024 ±0,010 | 0,024 ±0,010     | 0,024 ±0,010  |
|                            | 24h   | 0,031 ±0,014               | 0,031 ±0,014 | 0,031 ±0,014 | 0,031 ±0,014     | 0,031 ±0,014  |
| 3,0                        | 6h    | 0,040 ±0,010               | 0,017 ±0,017 | 0,025 ±0,017 | 0,011 ±0,009     | 0,006 ±0,005  |
|                            | 12h   | 0,047 ±0,009               | 0,020 ±0,014 | 0,031 ±0,010 | 0,015 ±0,009     | 0,008 ±0,006  |
|                            | 24h   | 0,043 ±0,011               | 0,023 ±0,012 | 0,036 ±0,013 | 0,018 ±0,008     | 0,010 ±0,005  |
| 3,5                        | 6h    | 0,014 ±0,009               | 0,006 ±0,004 | 0,023 ±0,013 | 0,014 ±0,011     | 0,005 ±0,004  |
|                            | 12h   | 0,016 ±0,006               | 0,010 ±0,006 | 0,023 ±0,013 | 0,019 ±0,011     | 0,008 ±0,003  |
|                            | 24h   | 0,019 ±0,009               | 0,017 ±0,002 | 0,028 ±0,011 | 0,021 ±0,010     | 0,012 ±0,003  |
| 4,0                        | 6h    | 0,016 ±0,006               | 0,021 ±0,010 | 0,015 ±0,014 | 0,021 ±0,006     | 0,010 ±0,004  |
|                            | 12h   | 0,023 ±0,004               | 0,021 ±0,010 | 0,018 ±0,015 | 0,025 ±0,006     | 0,015 ±0,003  |
|                            | 24h   | 0,025 ±0,005               | 0,025 ±0,010 | 0,022 ±0,015 | 0,029 ±0,003     | 0,016 ±0,004  |

\*Foram usados os intervalos iniciais e finais para biomassa e substrato (glicose + xilose).

**Fonte:** autoria própria.

Os tratamentos no geral apresentaram valores inferiores ou iguais ao controle, a não ser para o furfural na dose de 3,0 g.L<sup>-1</sup>, sendo que os valores de rendimento de biomassa dobraram nos tempos de 6 e 12 horas, quando comparado ao controle e em 24 horas, observando-se um aumento de 38%. Furfural e ácido fênico apresentaram a mesma tendência de menor rendimento

de biomassa com o aumento da dose. De acordo com os resultados, verifica-se que os fenóis e furfurais presentes podem causar estresse na levedura alterando a fisiologia durante o processo fermentativo, conforme relatado pela Fermentec (2010).

Desta forma os resultados mostram que a levedura *P. membranifaciens* LJ04 é capaz de crescer e consumir substrato de cinco e seis carbonos, mesmo na presença dos principais inibidores fermentativos. Entretanto, o ácido fórmico e o HMF apresentaram impacto expressivo sobre parâmetros avaliados, com redução do rendimento de biomassa, à medida que se aumentou as doses destes inibidores. Comportamento semelhante foi observado para o tratamento com ácido levulínico, nas doses de 3,0 a 3,5 g.L<sup>-1</sup>. Os rendimentos de biomassa foram menores para as doses maiores.

Diferente dos dados de cinética fermentativa, observa-se na Tabela 04 que não houve uma divergência estatística significativa entre os diferentes inibidores, por não levarem em conta fatores como velocidade de consumo de substrato, velocidade de crescimento e rendimento de biomassa. Razão pela qual não foram incluídos na análise utilizada, pois consiste na comparação das médias. A concentração de biomassa difere estatisticamente quando se compara os tempos, verifica-se maiores valores de biomassa no final do processo fermentativo, e os menores valores no início. Observou-se que em todos os tratamentos houve maior produção de biomassa durante o processo.

Essa diferença observada na interação entre dose e tempo está representada graficamente, através da Figura 02, onde pode-se observar que ao início do processo fermentativo, em média o tratamento controle apresentou menor concentração de células por litro. Ao final do processo fermentativo, não foi observada diferença estatística para concentração de células, e no tempo intermediário de 6 horas.

**Tabela 04** - Resultados médios, análise de variância e teste de Tukey para a concentração de biomassa em g.L<sup>-1</sup> produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses dos inibidores isolados de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido Fênico, Ácido Levulínico e Ácido Fórmico durante 24 horas

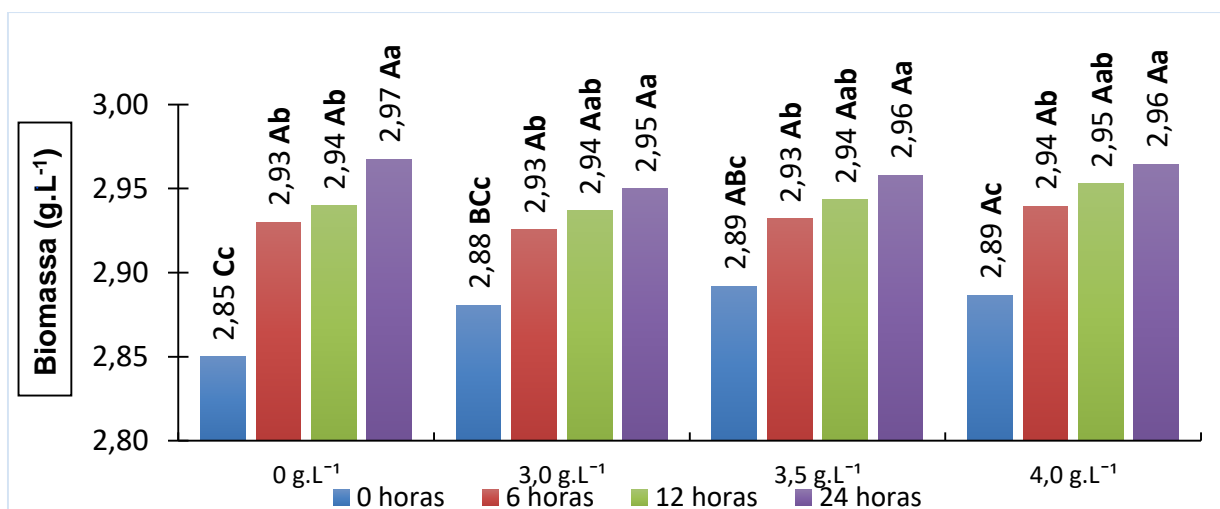
| Tratamentos         | Biomassa (g.L <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|-------------------------------|
| <b>Inibidor (I)</b> |                               |
| Furfural            | 2,923 a                       |
| HMF                 | 2,923 a                       |
| Ácido fênico        | 2,920 a                       |
| Ácido levulínico    | 2,932 a                       |
| Ácido fórmico       | 2,928 a                       |
| -----               | -----                         |
| Controle            | 2,922                         |
| -----               | -----                         |
| Teste F             | 0,76 ns                       |
| C.V.                | 1,3136                        |
| D.M.S.              | 0,0258                        |
| <b>Doses (D)</b>    |                               |
| 3,0                 | 2,917 a                       |
| 3,5                 | 2,930 a                       |
| 4,0                 | 2,935 a                       |
| Controle            | 2,922 a                       |
| -----               | -----                         |
| Teste F             | 2,00 ns                       |
| C.V.                | 1,4452                        |
| D.M.S.              | 0,0210                        |
| <b>Tempos (T)</b>   |                               |
| 0 horas             | 2,870 d                       |
| 6 horas             | 2,932 c                       |
| 12 horas            | 2,943 b                       |
| 24 horas            | 2,960 a                       |
| -----               | -----                         |
| Teste F             | 270,59**                      |
| C.V.                | 0,6355                        |
| D.M.S.              | 0,0088                        |
| I x D               | 1,26 ns                       |
| I x T               | 1,51 ns                       |
| D x T               | 3,06**                        |
| I x D x T           | 1,21 ns                       |

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 < p < 0,05$ ); ns não significativo ( $p > 0,05$ ).

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.

**Fonte:** autoria própria.

**Figura 02** - Desdobramento da interação entre tempo e doses para a Concentração de Biomassa produzida para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação.

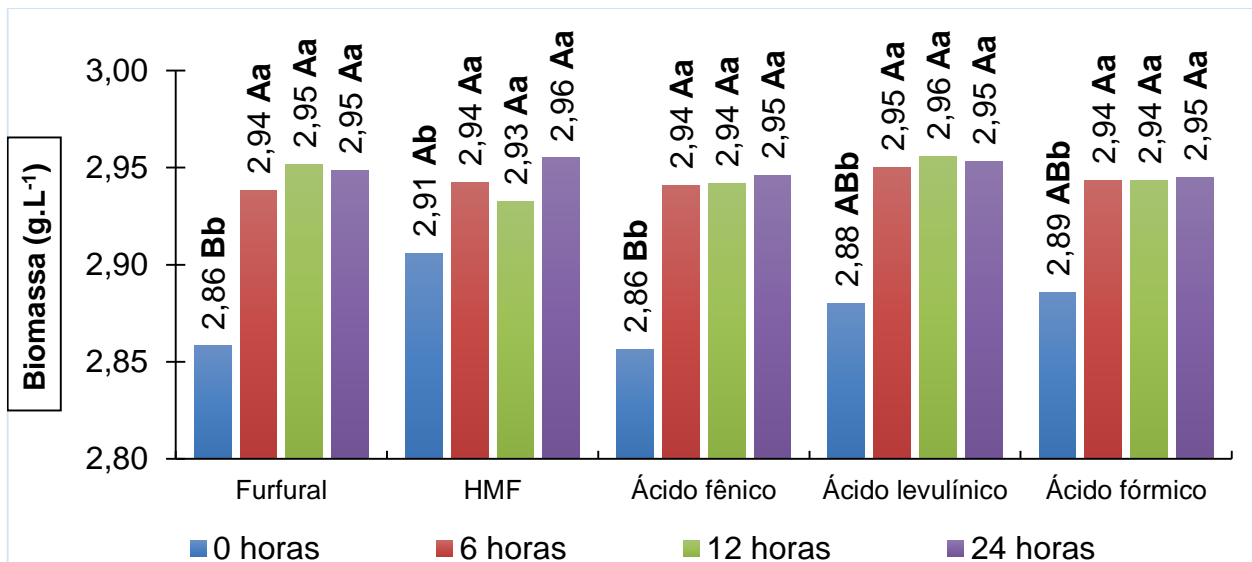


Letras minúsculas comparam tempo dentro de cada dose e letras maiúsculas comparam doses dentro de cada tempo.

**Fonte:** autoria própria.

No tempo intermediário de 12 horas, constatou-se diferença significativa, onde os maiores valores obtidos nesse caso foram para as doses de 3,5 e 4,0 g.L<sup>-1</sup>, demonstrando maior produção de biomassa antes do final do processo fermentativo. Esta ocorrência pode estar relacionada ao fato das células ao final do processo fermentativo serem induzidas a respiração em função de menor teor de açúcares disponíveis para serem metabolizados. Quando se observa o efeito dos inibidores e o parâmetro biomassa através da Figura 03, pode-se observar que existe uma diferença apenas na concentração inicial de células, com concentração menor encontrada para o furfural e ácido fênico; valores intermediários para os ácidos fórmico e levulínico, e a maior média observada para o valor inicial é encontrada no tratamento contendo furfural. Estudos realizados por Park, Cho e Chu (2005), demonstraram maior produção de biomassa na presença de fatores estressantes em *Rhodotorula glutinis*, sendo estas condições de estresse osmótico e de temperatura, a cepa da levedura produziu uma massa celular superior ao controle, demonstrando mecanismo de produção de biomassa a partir de estresse em leveduras.

**Figura 03** - Desdobramento da interação entre inibidores e tempo para a Concentração de Biomassa obtida para *Pichia membranifaciens* LJ04 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

**Fonte:** autoria própria.

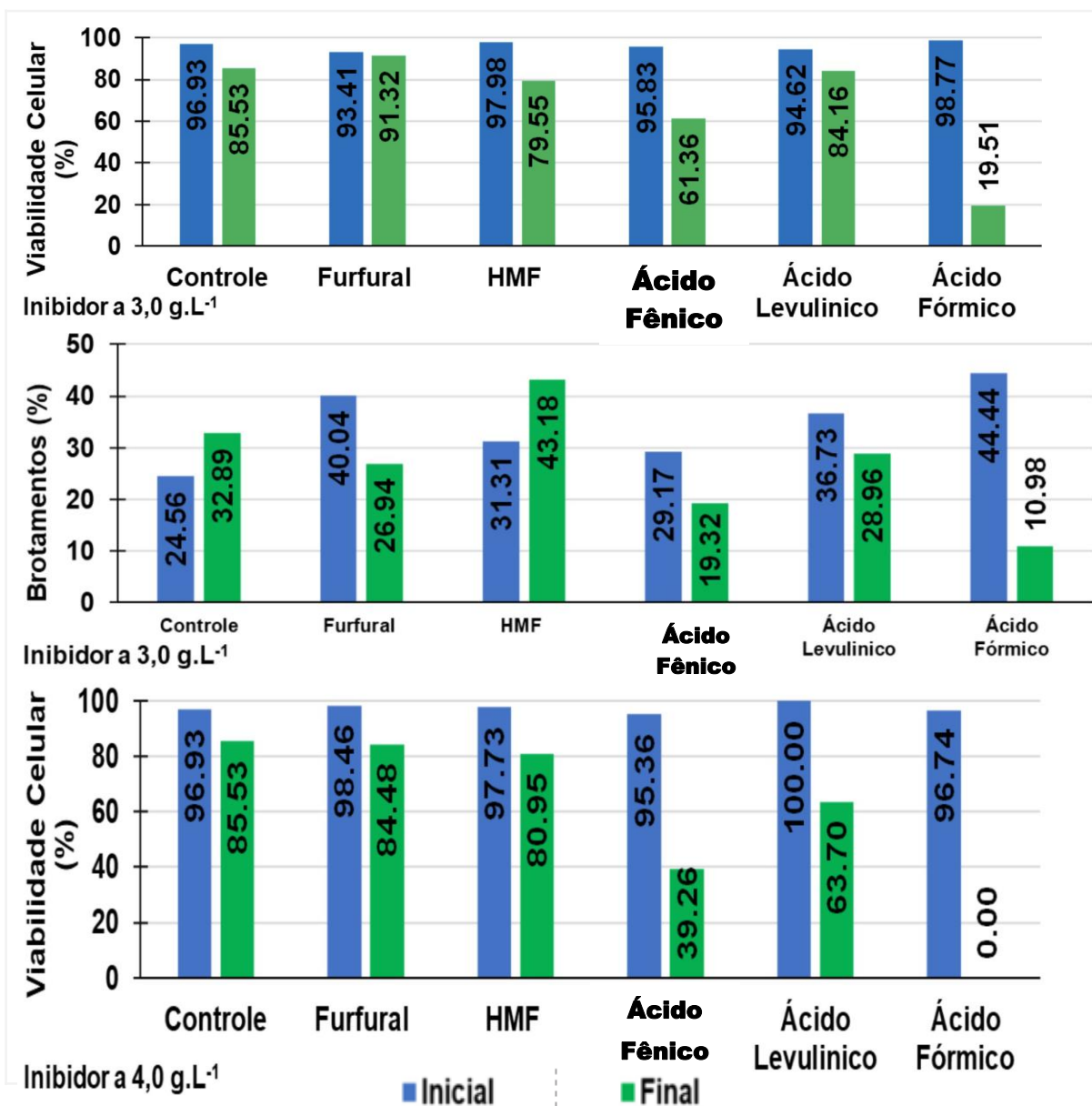
#### 4.2 Análises microbiológicas de inibidores isolados

Os resultados obtidos para viabilidade celular, Figura 04, demonstram tendência de menor porcentagem de células vivas com o aumento das doses dos inibidores, principalmente para os de natureza ácida. Os ácidos fênico e levulínico apresentaram redução de cerca de 20%, quando se compara a dose de 3,0 g.L<sup>-1</sup> com a de 4,0 g.L<sup>-1</sup>, demonstrando o efeito destes compostos sobre os processos fisiológicos da levedura, provocando maior morte celular à medida que a concentração inibidores foi aumentada.

O mesmo efeito foi observado para o ácido fórmico, porém diferente do observado para os ácidos fênico e levulínico, não foram encontradas células vivas no final do processo fermentativo, para a maior dose aplicada, indicando o forte efeito nocivo deste sobre as células. Relato de Gutierrez (1988) confirmam que os compostos de natureza ácida, de modo geral, afetam diretamente a membrana celular, causando a fissão das células, provocando a morte. Os compostos derivados de furano apresentaram valores mais constantes de

viabilidade das células, corroborando com as informações da literatura, uma vez que estes compostos afetam prioritariamente a estabilidade genética dos microrganismos, e em menor intensidade as membranas plasmáticas, ao contrário dos inibidores ácidos.

**Figura 04** - Resultados das análises de viabilidade celular para cada dose de inibidores isolados.

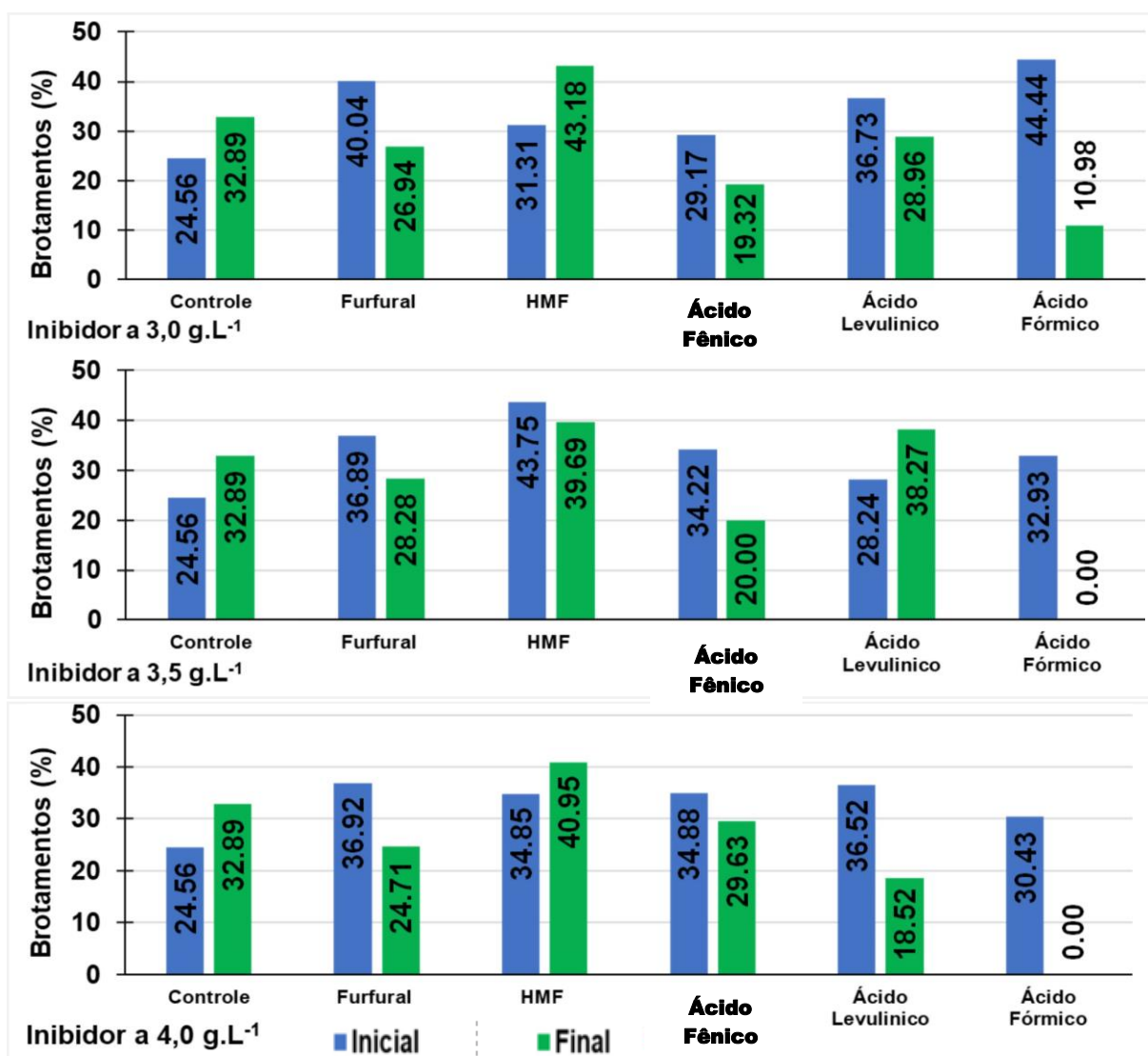


A cor azul representa o inóculo, ou tempo inicial (0 horas). A cor verde representa o tempo final (24 horas)

Fonte: autoria própria.

Quando se avalia a porcentagem de células que demonstram brotamento (%), Figura 05, verifica-se que, não há padrão de comportamento. Os valores apresentam estabilidade, mesmo com incremento das doses dos inibidores. Com exceção ao tratamento com ácido fórmico, os índices de brotamentos foram reduzidos a zero a partir da concentração de 3,5 g.L<sup>-1</sup>. Os resultados exibidos na Figura 04 corroboram estas informações, indicando que houve grande porcentagem de células mortas para o ácido fórmico, comparado aos demais.

**Figura 05** - Resultados das análises de brotamentos para cada dose de inibidores isolados. A cor azul representa o inóculo, ou tempo inicial (0 horas). A cor verde representa o tempo final (24 horas)

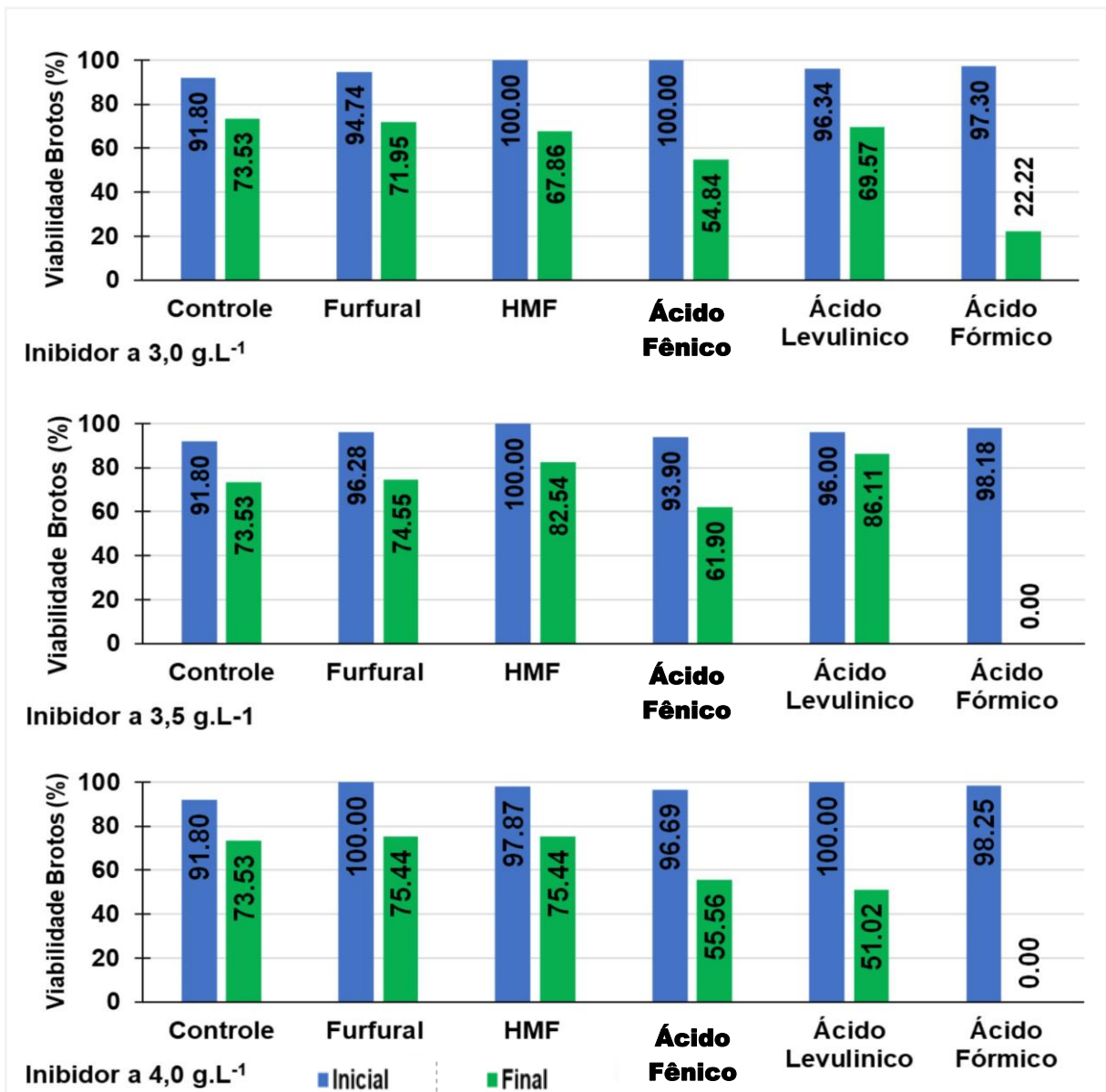


A cor azul representa o inóculo, ou tempo inicial (0 horas). A cor verde representa o tempo final (24 horas)

Fonte: autoria própria.

O mesmo padrão para os brotamentos fora observado para viabilidade dos brotos (%), Figura 06, onde não há padrão de comportamento com o aumento das doses, com a exceção do ácido fórmico, que foi o tratamento que demonstrou uma forte diminuição do parâmetro mesmo na menor dose estudada de 3,0 g.L<sup>-1</sup> e assim como na porcentagem de brotamentos, a partir da segunda maior dose, quando os brotamentos chegaram a 0%.

**Figura 06** - Resultados das análises de viabilidade dos brotos para cada dose de inibidores isolados.



A cor azul representa o inóculo, ou tempo inicial (0 horas). A cor verde representa o tempo final (24 horas)

**Fonte:** autoria própria.

Almeida et all. (2023) demonstraram que *Saccharomyces cerevisiae* se adaptou rapidamente ao hidrolisado de Pinus. Os pesquisadores observaram que, algumas cepas da levedura foram capazes de realizar o processo de destoxificação do meio, consumindo derivados de furano e compostos fenólicos, que foram convertidos em compostos menos danosos ao microrganismo. Este comportamento pode estar ocorrendo nesta pesquisa, uma vez que os resultados obtidos principalmente para os derivados de furano, em sua maior dose apresentaram 75% de viabilidade dos brotos.

Van Dijk et all. (2019) estudaram cepas industriais de *S. cerevisiae* utilizando hidrolisado de palha de trigo com 6,5 g.L<sup>-1</sup> glicose, 33,6 g.L<sup>-1</sup> HMF, e 4,3 g.L<sup>-1</sup> furfural, diluído em 80% e 90%. No final do processo fermentativo as 48 horas, determinaram viabilidade final das células que foi de 86%, sem o processo de adaptação da cepa, na diluição de 90% do hidrolisado. Nesta pesquisa, o inibidor Furfural na concentração de 4,0 g.L<sup>-1</sup> resultou em viabilidade de 75,44%. Na concentração de 3,0 g.L<sup>-1</sup>, o tratamento com ácido fórmico, a viabilidade apresentada foi de 22% (Figura 06).

Os resultados de viabilidade são na maioria congruentes com os resultados determinados na cinética fermentativa. Verifica-se, que em geral, de forma isolada, os ácidos influenciaram negativamente sobre os processo fisiológicos da cepa LJ04, provocando redução drástica da viabilidade. Efeitos mais intensos foram observados para os tratamentos com ácido fórmico nos quais a viabilidade foi reduzida a zero nas duas maiores doses. Para o furfural, a viabilidade celular determinada aproximou-se do controle, mesmo para as maiores concentrações. Para o tratamento com HMF, na dose de 4,0 g.L<sup>-1</sup>, houve redução de 5%.

#### **4.3 Rendimento de biomassa em associação**

Os resultados apresentados na Tabela 05, indicam que, diferentemente da ação dos inibidores isolados, quando os compostos foram adicionados em associação, proporcionaram estabilidade na concentração de células, para os tempos intermediários de 6 e 12 horas, não havendo diferença significativa, com valores médios bem próximos.

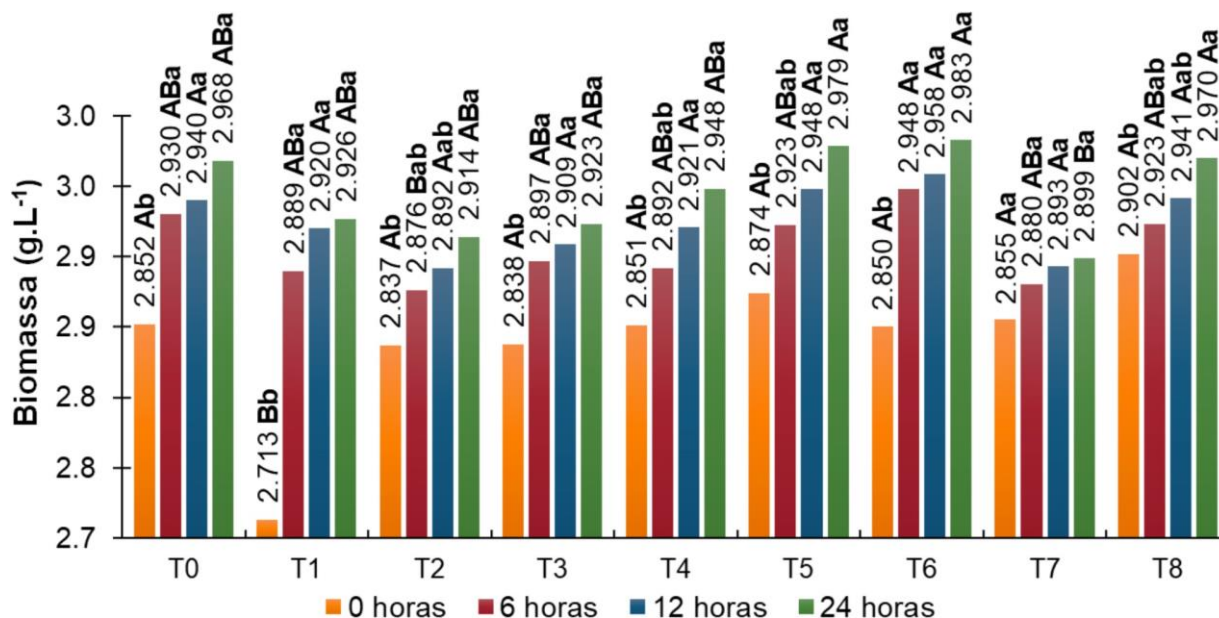
O controle apresentou a segunda maior média, sendo superado apenas pelos tratamentos 5, 6 e 8. Os menores valores médios para produção de biomassa foram encontrados nos tratamentos 1, 7 e 2, nos quais o fator comum entre eles é a maior concentração do ácido fórmico, que em associação com a maior dose de ácido fênico, reduziram significativamente a concentração de células.

De modo geral, verifica-se que os tratamentos com a menor dose de ácido fórmico foram os que mais se aproximaram do controle. Exceção deve ser destacada para o tratamento 3, que evidenciou as segundas menores médias. Essa diferença fica mais clara quando se analisa a Figura 07, que evidencia ligeira diferença nos tratamentos com os menores valores, em especial o tratamento 1, que no tempo inicial foi o único tratamento que demonstrou diferença significativa quando comparada ao tratamento controle e os demais tratamentos.

Os resultados corroboram com os relatos de Park, Cho e Chu (2005), que observaram maior produção de biomassa por *Rhodotorula glutinis* em condições estressantes. Nesta pesquisa, foram estudados condições de estresse osmótico e de pH. Neste contexto, pode-se verificar que os inibidores tiveram efeito estressante sobre a cepa LJ04 de *P. membranifaciens*, conforme evidenciam as diferenças de produção de biomassa (Tabela 05 e Figura 07).

Os resultados apresentados na Tabela 06 são congruentes com as interações observadas nas análises das médias acima, onde os tratamentos 1, 2, 7 e 8 tiveram uma redução de metade até de um quarto do rendimento de biomassa com base no consumo de substrato. Os tratamentos que apresentaram médias próximas ao controle, também demonstraram valores próximos ou um pouco abaixo.

**Figura 07** - Efeito da interação do fator A (inibidor) e fator B (tempo) na Concentração de Biomassa obtida para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação em associação.



Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada tratamento e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada tempo

**Fonte:** autoria própria.

Observa-se que os tratamentos que possuem a maior concentração dos ácidos, principalmente o ácido fórmico tendem a produzir menos biomassa, tanto quando se realiza a comparação das médias, quanto no caso da cinética fermentativa e da velocidade produção de biomassa com base no consumo de substrato. Isso pode indicar que esses ácidos estão afetando diretamente a fisiologia da *P. membranifaciens* LJ04, inibindo o crescimento celular da levedura e metabolismo.

Os efeitos dos inibidores em associação estão de acordo, com o que foi observado quando da análise nos mesmos em sua aplicação de forma isolada. Mesmo com doses menores, os compostos em associação, demonstraram efeito negativo similar, evidenciando que esses compostos quando estão presentes de forma combinada, no meio podem afetar de forma mais expressiva a fisiologia da cepa LJ04.

**Tabela 05** - Resultados médios, análise de variância e teste de Tukey para a concentração de biomassa em g.L<sup>-1</sup> produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses dos inibidores em associação, sendo: Furfural (FUR), Hidroximetilfurfural (HMF), Ácido Fênico (AFE), Ácido Levulínico (ALE) e Ácido Fórmico(AFO) durante 24 horas

| Tratamentos  | Biomassa (g.L <sup>-1</sup> ) |
|--|-------------------------------|
| <b>Tratamentos (Fator A)</b>                       |                               |
| Controle negativo                                  | 2,922 ab                      |
| Tratamento 1<br>FUR(+) HMF(-) AFE(+) ALE(-) AFO(+) | 2,862 d                       |
| Tratamento 2<br>FUR(-) HMF(+) AFE(-) ALE(-) AFO(+) | 2,880 cd                      |
| Tratamento 3<br>FUR(-) HMF(-) AFE(+) ALE(+) AFO(-) | 2,892 bcd                     |
| Tratamento 4<br>FUR(-) HMF(+) AFE(+) ALE(-) AFO(-) | 2,903 abc                     |
| Tratamento 5<br>FUR(+) HMF(-) AFE(-) ALE(-) AFO(-) | 2,931 a                       |
| Tratamento 6<br>FUR(+) HMF(+) AFE(-) ALE(+) AFO(-) | 2,935 a                       |
| Tratamento 7<br>FUR(+) HMF(+) AFE(+) ALE(+) AFO(+) | 2,882 cd                      |
| Tratamento 8<br>FUR(-) HMF(-) AFE(-) ALE(+) AFO(+) | 2,934 a                       |
| Teste F  | 12,14**                       |
| D.M.S.   | 0,0352                        |
| <b>Tempos (Fator B)</b>                            |                               |
| 0 horas  | 2,841 c                       |
| 6 horas  | 2,906 b                       |
| 12 horas   | 2,925 b                       |
| 24 horas   | 2,945 a                       |
| Teste F  | 75,33**                       |
| D.M.S.   | 0,0193                        |
| Interação A x B                                    | 2,63**                        |
| C.V.   | 0,9287504                     |

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 = < p < 0,05$ ); 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. A x B = Efeito da interação entre Fator A e Fator B.

(+1) = maior dose suportada pelas leveduras de 1,0 g.L<sup>-1</sup>.

(-1) = segunda maior dose suportada pelas leveduras 0,6 g.L<sup>-1</sup>.

**Fonte:** autoria própria.

**Tabela 06** - Resultados médios e desvio padrão obtidos para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses em associação Furfural (FUR), Hidroximetilfurfural (HMF), Ácido Fênico (AFE), Ácido Levulínico (ALE) e Ácido Fórmico (AFO) para rendimento de biomassa baseado no consumo de substrato ( $Y_{x/s}$ )

| <b>Tratamentos</b>  | <b>Tempo</b> | <b><math>Y_{x/s}</math> (g.g<sup>-1</sup>)*</b> |
|---|--------------|---|
| <b>Controle negativo</b>                                  | 6 horas      | 0,1815 ±0,0015                                  |
|   | 12 horas     | 0,1221 ±0,0015                                  |
|   | 24 horas     | 0,1129 ±0,0013                                  |
| <b>Tratamento 1</b><br>FUR(+) HMF(-) AFE(+) ALE(-) AFO(+) | 6 horas      | 0,0898 ±0,0022                                  |
|   | 12 horas     | 0,0414 ±0,0017                                  |
|   | 24 horas     | 0,0410 ±0,0016                                  |
| <b>Tratamento 2</b><br>FUR(-) HMF(+) AFE(-) ALE(-) AFO(+) | 6 horas      | 0,0557 ±0,0018                                  |
|   | 12 horas     | 0,0603 ±0,0019                                  |
|   | 24 horas     | 0,0765 ±0,0024                                  |
| <b>Tratamento 3</b><br>FUR(-) HMF(-) AFE(+) ALE(+) AFO(-) | 6 horas      | 0,2448 ±0,0028                                  |
|   | 12 horas     | 0,1596 ±0,0024                                  |
|   | 24 horas     | 0,1457 ±0,0023                                  |
| <b>Tratamento 4</b><br>FUR(-) HMF(+) AFE(+) ALE(-) AFO(-) | 6 horas      | 0,3036 ±0,0029                                  |
|   | 12 horas     | 0,1960 ±0,0026                                  |
|   | 24 horas     | 0,1540 ±0,0022                                  |
| <b>Tratamento 5</b><br>FUR(+) HMF(-) AFE(-) ALE(-) AFO(-) | 6 horas      | 0,1906 ±0,0026                                  |
|   | 12 horas     | 0,1413 ±0,0022                                  |
|   | 24 horas     | 0,1290 ±0,0024                                  |
| <b>Tratamento 6</b><br>FUR(+) HMF(+) AFE(-) ALE(+) AFO(-) | 6 horas      | 0,2454 ±0,0021                                  |
|   | 12 horas     | 0,1898 ±0,0025                                  |
|   | 24 horas     | 0,1588 ±0,0022                                  |
| <b>Tratamento 7</b><br>FUR(+) HMF(+) AFE(+) ALE(+) AFO(+) | 6 horas      | 0,0354 ±0,0019                                  |
|   | 12 horas     | 0,0386 ±0,0018                                  |
|   | 24 horas     | 0,0426 ±0,0016                                  |
| <b>Tratamento 8</b><br>FUR(-) HMF(-) AFE(-) ALE(+) AFO(+) | 6 horas      | 0,0654 ±0,0012                                  |
|   | 12 horas     | 0,0648 ±0,0011                                  |
|   | 24 horas     | 0,0756 ±0,0021                                  |

\*Foram usados os intervalos iniciais e finais para biomassa e substrato (glicose + xilose). (+1) = maior dose suportada pelas leveduras de 1,0 g.L<sup>-1</sup>. (-1) = segunda maior dose suportada pelas leveduras 0,6 g.L<sup>-1</sup>.

**Fonte:** autoria própria.

De modo semelhante como no ensaio com os inibidores isolados, os tratamentos com maiores concentrações de ácido fórmico, foram determinantes para a redução dos parâmetros avaliados, em quase todos os casos, reduzindo de forma significativa o consumo da glicose.

#### **4.4 Análises microbiológicas - inibidores em associação**

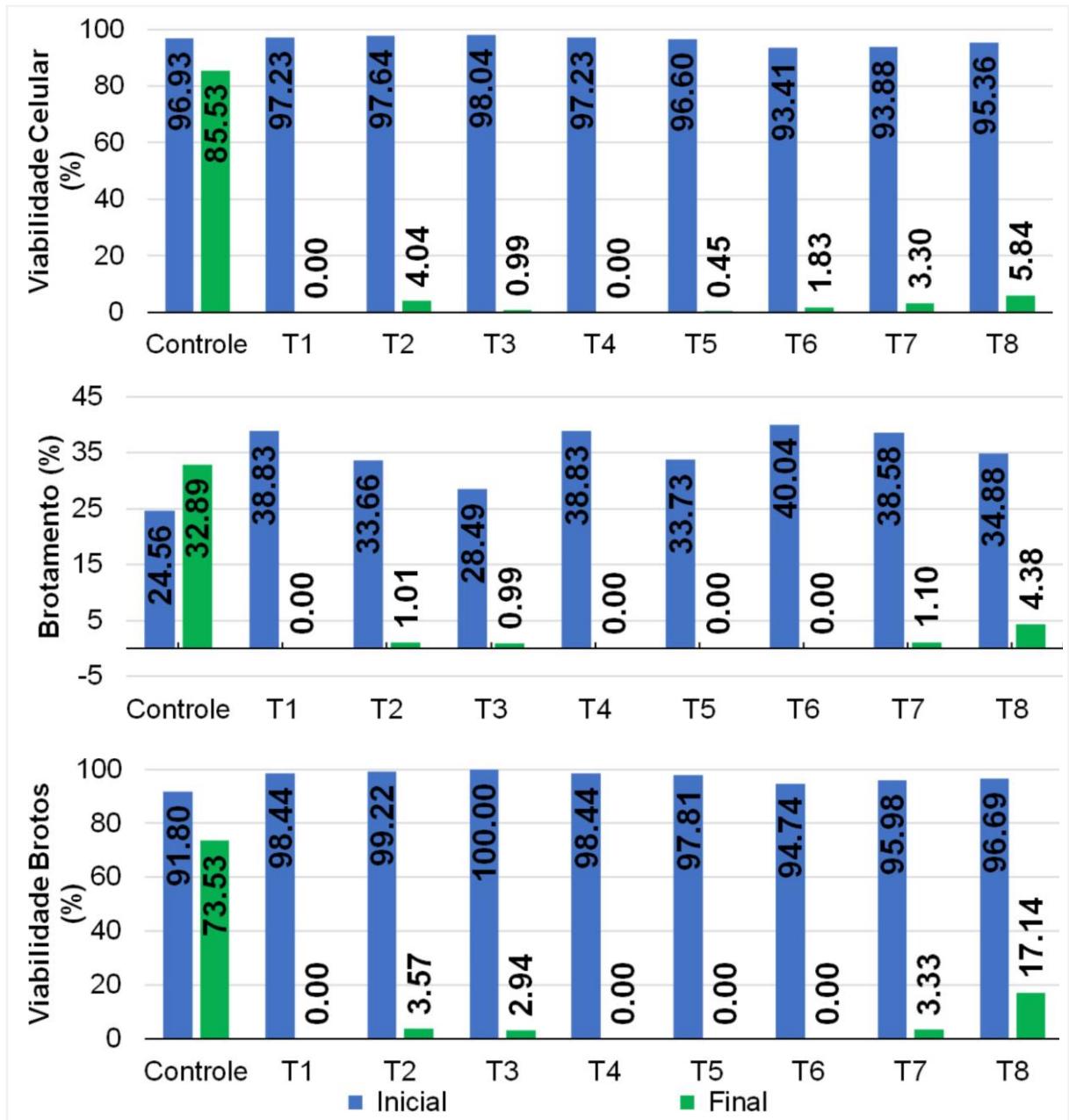
De modo geral, o padrão observado para o efeito dos inibidores em associação sobre a viabilidade das células de leveduras, evidenciam redução muito expressiva dos parâmetros avaliados. A análise da figura 08, evidencia que ao final do processo fermentativo não foram observadas viabilidades superiores a 6%, com taxas de morte celular se aproximando a 100%. Os tratamentos 1 e 4 resultaram em morte celular de 100%.

Os dados obtidos mostram que os compostos avaliados, quando associados, mesmo que em doses menores, afetaram de forma mais expressiva a fisiologia de *P. Membranifaciens*, provocando a morte celular e inibição dos brotamentos, especialmente na presença do ácido fórmico. Em todos os tratamentos, mesmo que em doses consideradas baixas, pode explicar os dados de viabilidade obtidos, o composto de forma isolada demonstrou seu potencial de inibição da fermentação e de altas taxas de morte celular.

#### **4.5 Efeito dos inibidores isolados no substrato**

Segundo relatos de Ribeiro (2019), a cepa LJ04 tem habilidade de metabolizar Xilose. Neste contexto, esperava-se que o consumo desse açúcar fosse semelhante ao da glicose, conforme Tabela 07. Entretanto, de modo geral, com exceção dos ácidos levulínico e fórmico, a levedura apresentou consumo ligeiramente maior dos açúcares quando comparado ao controle. Ao contrário dos dados de cinética fermentativa, na qual o tratamento com HMF apresentou maior velocidade de consumo de substrato que o controle, conforme tabela 07, verifica-se que houve maior sobra de glicose.

**Figura 08** - Resultados das análises de viabilidade dos brotos para cada dose de inibidores em associação.



A cor azul representa o inóculo, ou tempo inicial (0 horas). A cor verde representa o tempo final (24 horas)

**Fonte:** autoria própria.

**Tabela 07** - Resultados médios, análise de variância e teste de Tukey para a concentração de glicose e xilose em g.L<sup>-1</sup> consumida por *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses dos inibidores isolados: Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido Fênico, Ácido Levulínico e Ácido Fórmico durante 24 horas

| Tratamentos         | Glicose (g.L <sup>-1</sup> ) | Xilose (g.L <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|------------------------------|-----------------------------|
| <b>Inibidor (I)</b> |                              |                             |
| Furfural            | 5,025 c                      | 39,056 a                    |
| HMF                 | 5,540 b                      | 38,478 b                    |
| Ácido fênico        | 4,924 c                      | 37,371 d                    |
| Ácido levulínico    | 4,498 d                      | 36,985 e                    |
| Ácido fórmico       | 11,768 a                     | 38,145 c                    |
| Controle            | 4,859                        | 39,404                      |
| Teste F             | 157,67**                     | 307,93**                    |
| C.V.                | 2,164                        | 0,7084                      |
| D.M.S.              | 0,1378                       | 0,2700                      |
| <b>Doses (D)</b>    |                              |                             |
| 3,0                 | 6,887 b                      | 38,117 b                    |
| 3,5                 | 6,943 a                      | 37,346 c                    |
| 4,0                 | 6,714 c                      | 37,161 d                    |
| Controle            | 4,859 d                      | 39,404 a                    |
| Teste F             | 486,45**                     | 831,30**                    |
| C.V.                | 0,4513                       | 0,0588                      |
| D.M.S.              | 0,0274                       | 0,0144                      |
| <b>Tempos (T)</b>   |                              |                             |
| 0 horas             | 19,331 a                     | 42,182 a                    |
| 6 horas             | 2,236 b                      | 38,207 b                    |
| 12 horas            | 1,971 c                      | 36,438 c                    |
| 24 horas            | 1,867 d                      | 35,201 d                    |
| Teste F             | 263,25**                     | 741,587**                   |
| C.V.                | 0,5312                       | 0,0588                      |
| D.M.S.              | 0,0199                       | 0,0132                      |
| I x D               | 421,08**                     | 185,39**                    |
| I x T               | 488,68**                     | 147,78**                    |
| D x T               | 482,81**                     | 164,15**                    |
| I x D x T           | 678,06**                     | 105,45**                    |

\*\*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.

**Fonte:** autoria própria.

Por outro lado, observou-se diferença estatística entre todos os parâmetros avaliados para glicose e xilose, com interação significativa ao nível de 1% de probabilidade. Como esperado, o maior valor médio dos açúcares foi determinado no tempo inicial, enquanto a menor concentração de açúcares foi observada no final do processo fermentativo no tempo de 24 horas.

A maior concentração de glicose foi observada para o tratamento com ácido fórmico, com o valor de  $11,76 \text{ g.L}^{-1}$ , representando aumento de 140% em comparação com o controle. Para o ácido levulínico, único tratamento com concentração média menor de glicose, com o valor de  $4,49 \text{ g.L}^{-1}$ , representou diminuição de 7,5% em comparação com o controle.

Analisando-se a Figura 09, verifica-se que os tratamentos HMF e ácido levulínico apresentaram o consumo completo da glicose no meio a partir de 6 horas do início do processo fermentativo. Para o tratamento com furfural e ácido fênico esse esgotamento ocorreu entre 12-24 horas do processo. Considerando-se o tratamento com ácido fórmico, não houve esgotamento da glicose. Ao final do processo fermentativo ainda restava  $9,3 \text{ g.L}^{-1}$  da hexose no meio, evidenciando grande efeito desse inibidor sobre a fisiologia desta cepa de levedura, afetando o processo de fermentação da *P. membranifaciens* LJ04, corroborando as discussões anteriores.

O ácido fênico também teve um efeito expressivo no consumo de glicose, em 6 horas ainda restava  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  do açúcar no meio com o inibidor, a levedura teve dificuldade em metabolizar rapidamente o substrato, ocorrendo o consumo completo apenas depois de 12 horas de processo fermentativo.

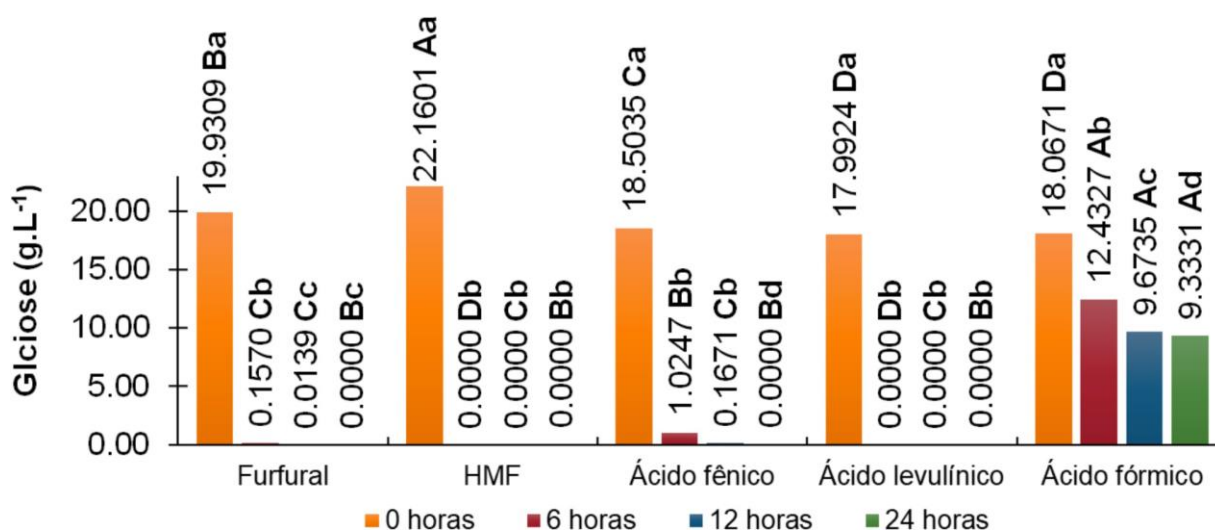
Comparando os tratamentos com doses e o controle ao longo do tempo, através da Figura 10, verifica-se que houve diferenças estatística entre estes parâmetros. Para a dose de  $3,5 \text{ g.L}^{-1}$  determinou-se os maiores valores médios para 6, 12 e 24 horas, enquanto para 0 horas a dose de  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$  foi a que apresentou o maior valor. Os resultados são consistentes com as taxas de consumo determinadas e as médias obtidas.

A xilose apresentou comportamento no qual não houve consumo completo em qualquer dos tratamentos, conforme relatado por Ribeiro (2019). Na Figura 11, pode-se observar um comportamento similar de consumo da

pentose entre os tratamentos, porém com diferenças estatisticamente significantes entre os inibidores. O maior consumo do açúcar foi observado para o tratamento com ácido fênico, sendo que às 24 horas apresentou média de 34,58 g.L<sup>-1</sup>, totalizando o consumo de pouco mais de 10,0 gramas de açúcar.

O menor consumo foi apresentado para o tratamento com o ácido fórmico, que as 24 horas apresentou uma concentração de 36,12 g.L<sup>-1</sup>, significativamente maior que os demais, totalizando teores inferiores a 9,0 gramas de açúcar consumido. Ao longo do período fermentativo, os tratamentos demonstraram gradativa diminuição da velocidade de consumo do açúcar de cinco carbonos.

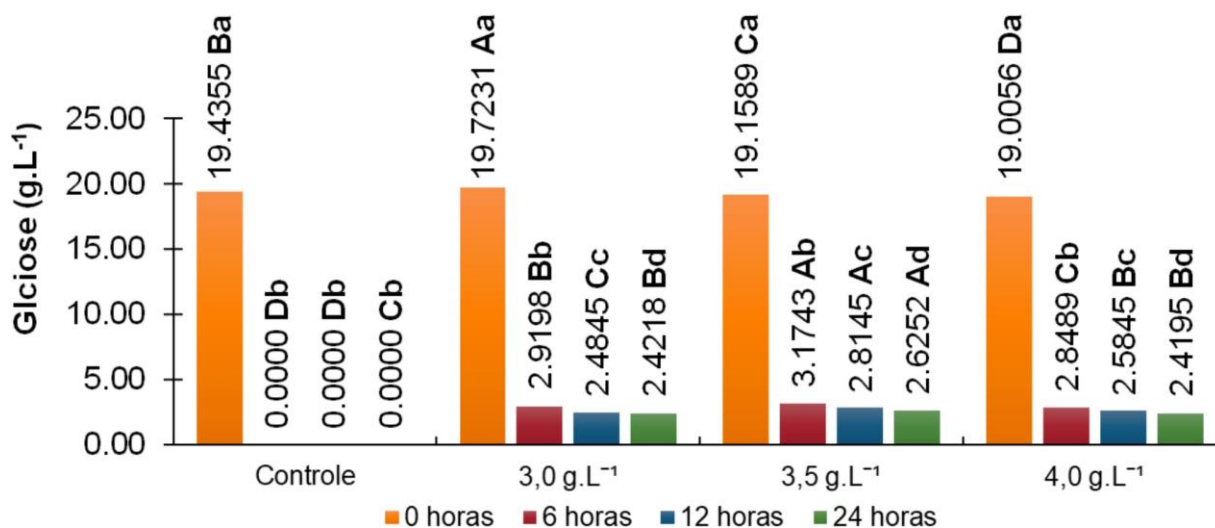
**Figura 09** - Desdobramento da interação entre inibidores e tempo para a Concentração de Glicose obtida para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação.



Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada tempo

**Fonte:** autoria própria.

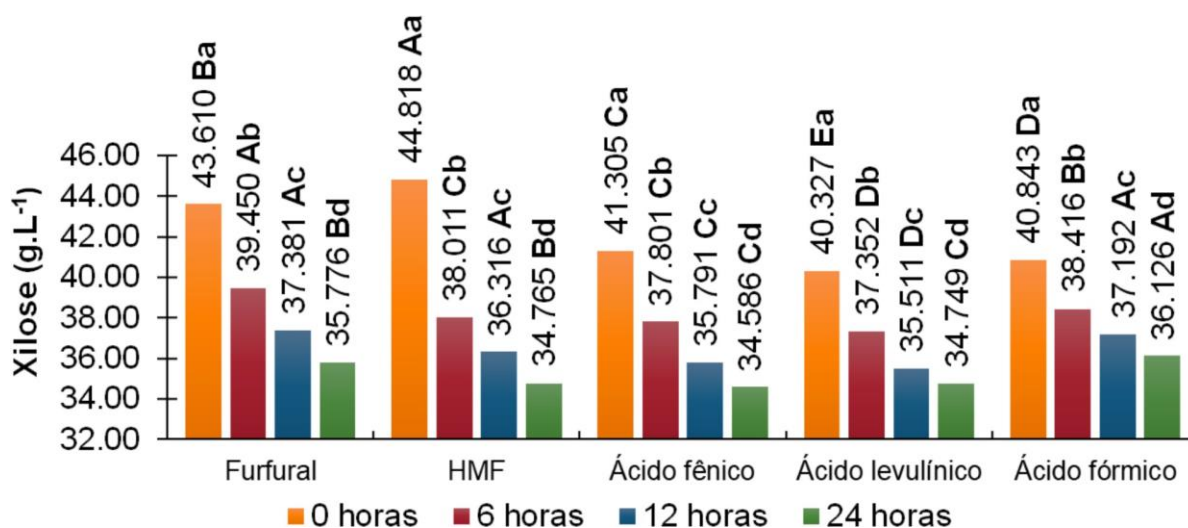
**Figura 10** - Desdobramento da interação entre doses e tempo para a Concentração de Glicose obtida para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação.



Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada dose e letras maiúsculas comparam cada dose dentro dos tempos

Fonte: autoria própria.

**Figura 11** - Desdobramento da interação entre inibidores e tempo para a Concentração de Xilose obtida para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação.

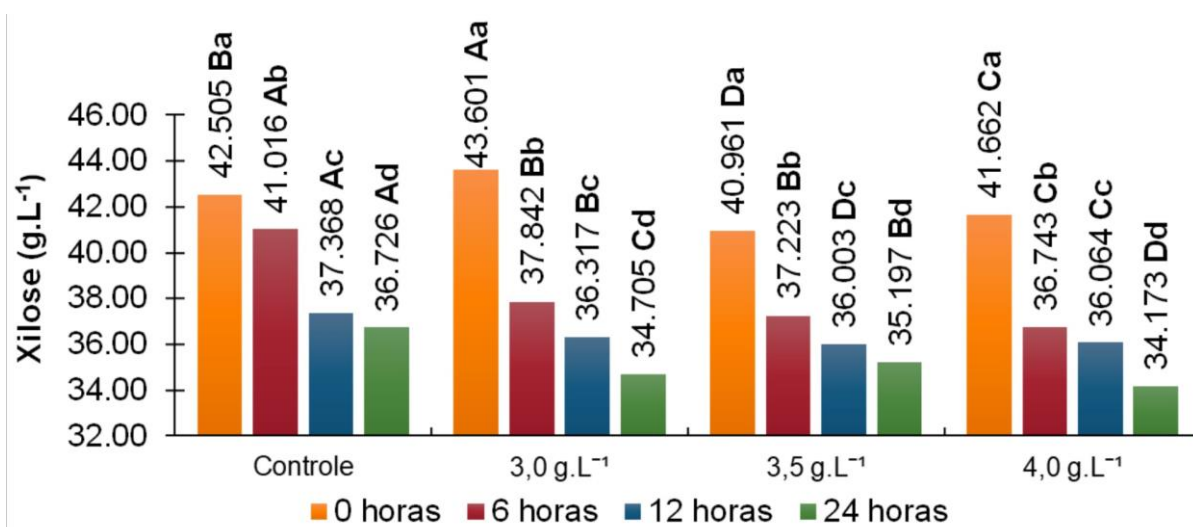


Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada tempo

Fonte: autoria própria.

Através da Figura 12, observa-se que o comportamento apresentado foi de aumento no consumo de xilose em todas as doses, para os tratamentos contendo inibidores, em comparação com o controle. O maior consumo de pentose foi registrado às 24 horas, para a dose de 4.0 g.L<sup>-1</sup> de inibidores, com média de 2,5 gramas de xilose consumidos a mais em relação ao controle. Este aumento pode ser possível resposta da cepa LJ04, que na presença dos inibidores metaboliza xilose, possivelmente devido à ausência de glicose no meio.

**Figura 12** - Desdobramento da interação entre doses e tempo para a Concentração de Xilose obtida para *Pichia membranifaciens* LJ04 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

**Fonte:** autoria própria.

O consumo do açúcar de cinco carbonos (pentoses), foi maior no tratamento com concentração de 3,0 g.L<sup>-1</sup> dos inibidores estudados, sendo que no intervalo de 0-6 horas foram consumidos quase 5,0 gramas da pentose. Neste intervalo, o tratamento controle apresentou consumo pouco superior a 1,0 grama em média. Os resultados obtidos para o consumo dos substratos, apresentaram comportamento similar, do efeito destes sobre a fisiologia da *P. membranifaciens*. Os inibidores, principalmente o ácido fórmico, provocaram redução da viabilidade das células, baixos rendimentos de biomassa, não houve consumo total de glicose, além de morte das células.

#### 4.6 Efeito dos inibidores em associação no substrato

Os resultados obtidos evidenciaram que os inibidores em associação também tiveram grande efeito negativo sobre a fisiologia da cepa LJ04. De modo semelhante, para os tratamentos nos quais o ácido fórmico esteve presente de forma isolada, Tabela 08, em concentrações maiores, houve inibição da produção de biomassa, assim como na concentração glicose residual.

A maior média para glicose foi observada no tratamento 7, que se caracterizou pela associação dos inibidores estudados em suas maiores doses, seguidos pelos tratamentos nos quais havia a presença do ácido fórmico em maior dose (1, 2, 7 e 8). Nestes casos, verificou-se maiores médias residuais de glicose, quando comparada ao controle, assim como aos demais tratamentos. Quando a concentração do ácido foi a menor houve o consumo total da glicose.

Através da Figura 13 observa-se diferença estatística para a maioria dos tratamentos, considerando-se a diferença entre a concentração inicial e final de pentoses. Verifica-se que para todos os tratamentos estudados, houve maior consumo de xilose, com a presença de inibidores. Para os tratamentos 3, 7 e 8 houve diferença de até 1,0 grama a mais de consumo da pentose, sendo que em média este foi de aproximadamente 6,0 gramas. Para os tratamentos 1, 2, 4, 5 e 6 tem-se consumo que variou de 25% a 90%, com destaque para os tratamentos 4 e 5 que representaram quase 10,0 g.L<sup>-1</sup> de consumo.

Neste contexto, observa-se que sob condições estressantes há tendência da *P. membranifaciens* LJ04 em consumir mais xilose em média, e especialmente na presença do ácido fórmico, na concentração de 3,0 g.L<sup>-1</sup>, acarretou consumo parcial de glicose, quando em associação com os outros inibidores, mesmo em doses menores.

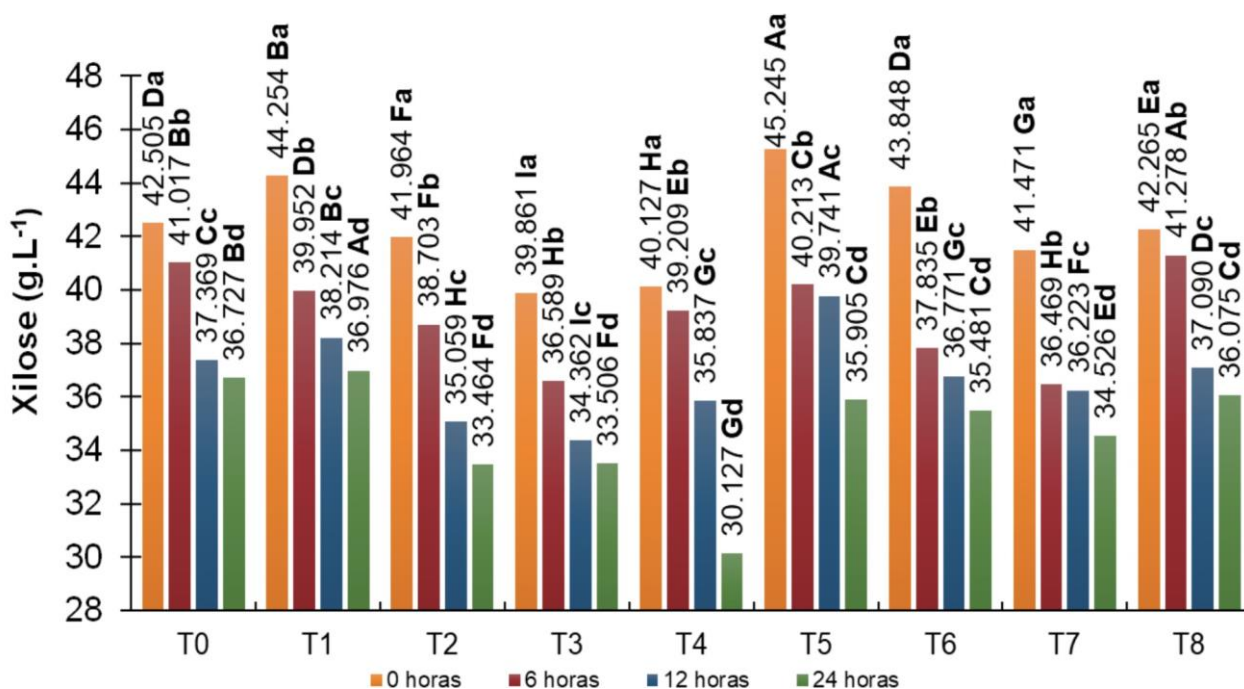
**Tabela 08** - Resultados médios, análise de variância e teste de Tukey para a concentração de xilose e glicose em  $\text{g.L}^{-1}$  produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses dos inibidores em associação, sendo: Furfural(FUR), Hidroximetilfurfural(HMF), Ácido Fênico(AFE), Ácido Levulínico(ALE) e Ácido Fórmico(AFO) durante 24 horas

| Tratamentos  | Glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) | Xilose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) |
|--|-------------------------------|------------------------------|
| <b>Tratamentos (Fator A)</b>                       |                               |                              |
| Controle negativo                                  | 4,859 f                       | 39,404 c                     |
| Tratamento 1<br>FUR(+) HMF(-) AFE(+) ALE(-) AFO(+) | 15,905 b                      | 39,849 b                     |
| Tratamento 2<br>FUR(-) HMF(+) AFE(-) ALE(-) AFO(+) | 14,867 c                      | 37,298 f                     |
| Tratamento 3<br>FUR(-) HMF(-) AFE(+) ALE(+) AFO(-) | 4,696 g                       | 36,080 i                     |
| Tratamento 4<br>FUR(-) HMF(+) AFE(+) ALE(-) AFO(-) | 4,794 f                       | 36,325 h                     |
| Tratamento 5<br>FUR(+) HMF(-) AFE(-) ALE(-) AFO(-) | 5,030 e                       | 40,277 a                     |
| Tratamento 6<br>FUR(+) HMF(+) AFE(-) ALE(+) AFO(-) | 4,805 f                       | 38,484 e                     |
| Tratamento 7<br>FUR(+) HMF(+) AFE(+) ALE(+) AFO(+) | 16,484 a                      | 37,172 g                     |
| Tratamento 8<br>FUR(-) HMF(-) AFE(-) ALE(+) AFO(+) | 13,384 d                      | 39,177 d                     |
| Teste F  | 727,31**                      | 387,74**                     |
| D.M.S.   | 0,0952                        | 0,1166                       |
| <b>Tempos (Fator B)</b>                            |                               |                              |
| 0 horas  | 18,973 a                      | 42,393 a                     |
| 6 horas  | 7,278 b                       | 39,029 b                     |
| 12 horas   | 6,522 c                       | 36,741 c                     |
| 24 horas   | 4,926 d                       | 34,754 d                     |
| Teste F  | 223,98**                      | 387,35**                     |
| D.M.S.   | 0,0518                        | 0,0635                       |
| Interação A x B                                    | 945,85**                      | 541,17**                     |
| C.V.   | 0,6125872                     | 0,1849643                    |

\*\*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. A x B = Efeito da interação entre Fator A e Fator B. (+1) = maior dose suportada pelas leveduras de 1,0  $\text{g.L}^{-1}$ . (-1) = segunda maior dose suportada pelas leveduras 0,6  $\text{g.L}^{-1}$ .

**Fonte:** autoria própria

**Figura 13** - Efeito da interação do fator A (tratamento) e fator B (tempo) na concentração de xilose obtida para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação em associação.



Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada tratamento e letras maiúsculas comparam tratamentos dentro de cada tempo

**Fonte:** autoria própria.

#### 4.7 Efeito dos inibidores isolados nos produtos

Analisando-se a Tabela 09, verifica-se diferença estatística significativa para a produção de etanol, considerando-se os tratamentos, doses e tempos estudados. Entretanto, para a produção de glicerol houve diferença estatística apenas para a doses e tempos. De modo semelhante ao que já foi descrito anteriormente, quando o ácido fórmico está presente no tratamento, determinou-se menor produção em média de etanol, visto que o açúcar presente no mosto não foi convertido em etanol. Este comportamento fisiológico da levedura foi decorrente dos danos provocados por este ácido, conforme já considerado.

**Tabela 09** - Resultados médios, análise de variância e teste de Tukey para a concentração de etanol e glicerol ( $\text{g.L}^{-1}$ ) produzidos por *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido Fênico, Ácido Levulínico e Ácido Fórmico durante 24 horas

| Tratamentos          | Etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ) | Glicerol ( $\text{g.L}^{-1}$ ) |
|----------------------|------------------------------|--------------------------------|
| <b>Inibidor (I)</b>  |                              |                                |
| Furfural             | 5,097 bc                     | 0,388 a                        |
| Hidroximetilfurfural | 5,322 b                      | 0,439 a                        |
| Ácido fênico         | 5,677 a                      | 0,269 a                        |
| Ácido levulínico     | 4,927 c                      | 0,304 a                        |
| Ácido fórmico        | 3,384 d                      | 0,242 a                        |
| Controle             | 5,088                        | 0,280                          |
| Teste F              | 318,99**                     | 3,12 ns                        |
| C.V.                 | 4,9607                       | 69,9131                        |
| D.M.S.               | 0,2804                       | 0,2658                         |
| <b>Doses (D)</b>     |                              |                                |
| Controle             | 5,088 a                      | 0,280 b                        |
| 3,0                  | 4,742 d                      | 0,343 a                        |
| 3,5                  | 4,872 b                      | 0,344 a                        |
| 4,0                  | 4,823 c                      | 0,345 a                        |
| Teste F              | 160,65**                     | 47,20**                        |
| C.V.                 | 0,1309                       | 7,8658                         |
| D.M.S.               | 0,0048                       | 0,0192                         |
| <b>Tempos (T)</b>    |                              |                                |
| 6 horas              | 5,480 a                      | 0,280 c                        |
| 12 horas             | 4,629 b                      | 0,331 b                        |
| 24 horas             | 4,535 c                      | 0,372 a                        |
| Teste F              | 265,60**                     | 126,96**                       |
| C.V.                 | 0,1309                       | 7,8658                         |
| D.M.S.               | 0,0035                       | 0,0141                         |
| I x D                | 568,95**                     | 37,40**                        |
| I x T                | 257,85**                     | 34,87**                        |
| D x T                | 823,73**                     | 44,76**                        |
| I x D x T            | 273,64**                     | 16,14**                        |

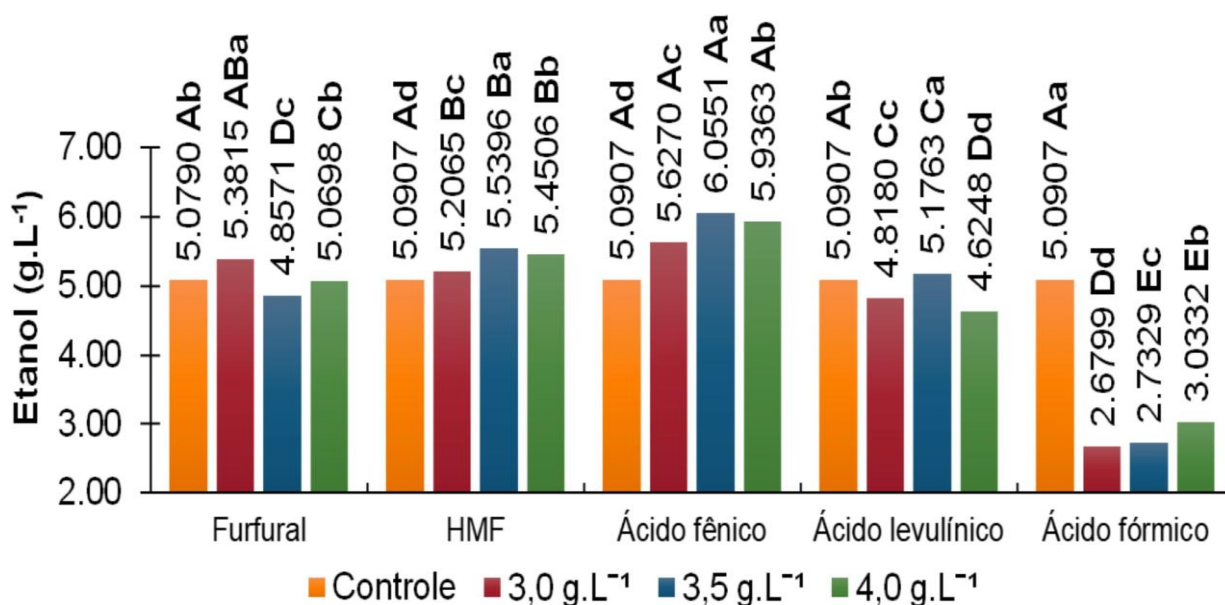
\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 = p < 0,05$ ); ns não significativo ( $p \geq 0,05$ ). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (5%). p = Diferença significativa entre 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.

**Fonte:** autoria própria.

O ácido fórmico apresentou a menor média de etanol produzido, da ordem de 3,38 g.L<sup>-1</sup>, representando redução de cerca de 33% se comparado ao controle. O maior valor observado foi 5,67 g.L<sup>-1</sup> para o tratamento com ácido fênico, significando acréscimo de pouco mais de 11% quando comparado ao tratamento controle. Quando se adicionou furfural e ácido levulínico aos tratamentos, as médias foram muito próximas ao tratamento controle, com cerca de 5,0 g.L<sup>-1</sup> de etanol produzido.

A Figura 14 apresenta as médias obtidas para as doses estudadas em comparação com o grupo controle. Da sua análise verifica-se grande variação entre os resultados determinados, com menores valores médios para o tratamento com ácido fórmico, sendo as maiores médias de 4,0 g.L<sup>-1</sup> a 3,03 g.L<sup>-1</sup> de etanol produzido. Os maiores valores médios foram determinados para o tratamento com a presença do ácido fênico, sendo que nas doses de 3,5 e 4,0 g.L<sup>-1</sup> do inibidor obteve-se média de 6,0 g.L<sup>-1</sup> de etanol produzido.

**Figura 14** - Desdobramento da interação entre inibidores e doses para a Concentração de Etanol obtida para *Pichia membranifaciens* LJ04 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

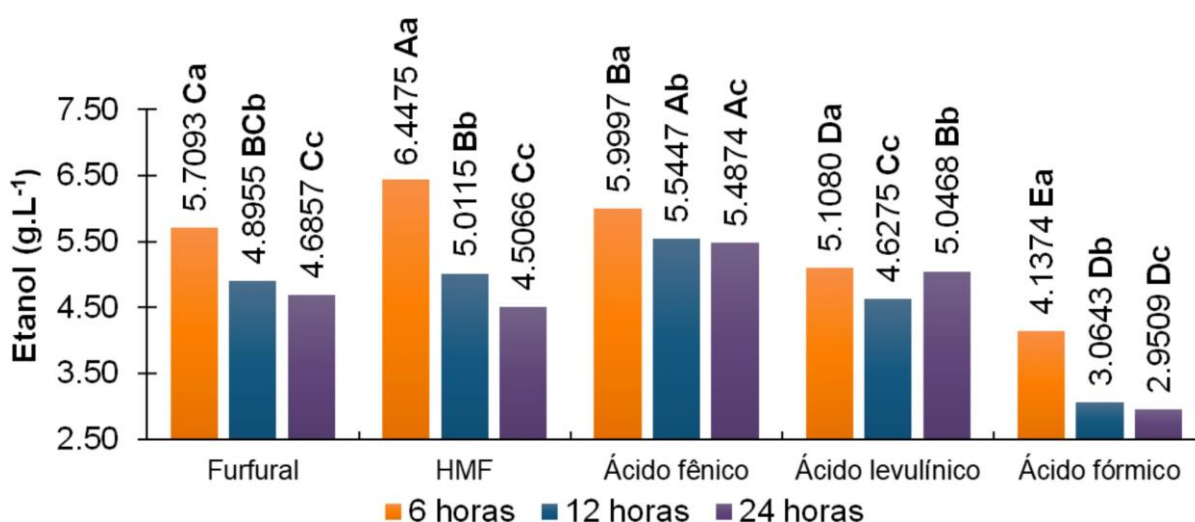
Fonte: autoria própria.

Os tratamentos com ácido fórmico, e ácido levulínico também apresentaram menores produções de etanol, em especial para a dose de 4,0 g.L<sup>-1</sup>. Na Figura 15, verifica-se redução da concentração de etanol ao longo do processo fermentativo. Exceção para o tratamento com ácido fênico. Observa-se que a maior parte do etanol foi produzido nas primeiras 6 horas, a partir desse momento, com o esgotamento dos açúcares no mosto, a levedura provavelmente, passou a consumir etanol, transformando-o em ácido acético, conforme relatou Ribeiro (2019).

Observando a produção de etanol ao longo do tempo na Figura 15, pode-se observar que para a maioria dos tratamentos a concentração foi superior a 5,0 g.L<sup>-1</sup> após 6 horas. Excessão ao tratamento com ácido fórmico, que registrou valor médio de 4,13 g.L<sup>-1</sup>. Para o tratamento com HMF a produção foi de 6,44 g.L<sup>-1</sup> de etanol, que apresentou a maior redução na concentração de etanol, perdendo ou metabolizando cerca de 2,5 g.L<sup>-1</sup>.

A produção de glicerol é essencial para diversos tipos de fermentações, sendo que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* coproduz este composto com o etanol, aumenta o conteúdo do íon de sódio celular reduzindo drasticamente o conteúdo de aminoácidos, purinas e íons de potássio, possibilitando maior viabilidade e crescimento celular.

**Figura 15** - Desdobramento da interação entre inibidores e tempo para a concentração de Etanol obtida para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação.



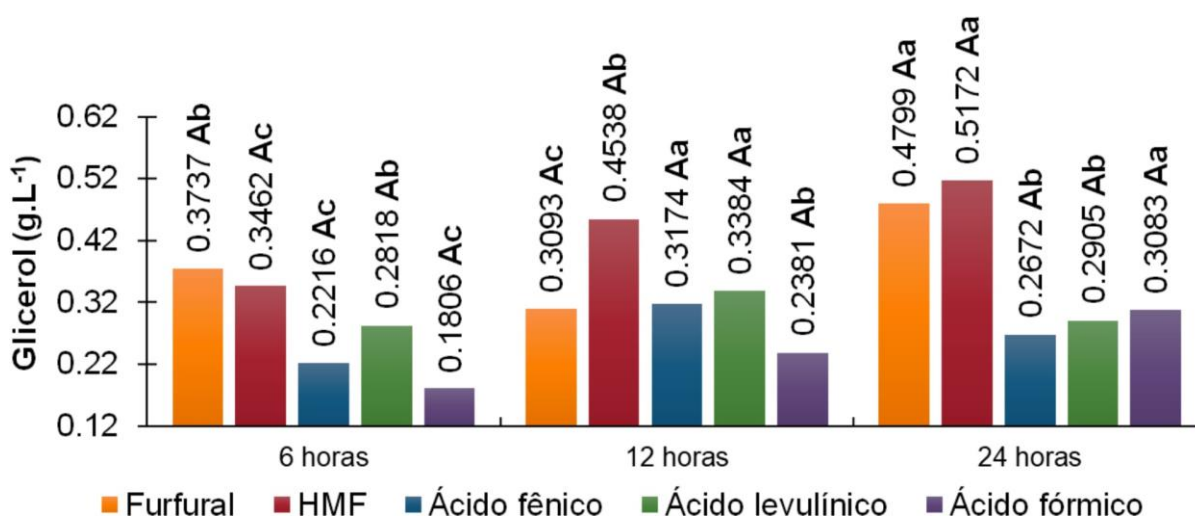
Letras minúsculas comparam os tempos dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada tempo

**Fonte:** autoria própria.

Analisando-se a Figura 16, verifica-se que não há correlação linear entre a produção de etanol e de glicerol. Pode-se constatar que as médias de produção de glicerol foram mais elevadas para os tratamentos com hidroximetilfurfural e furfural, compostos conhecidos por sua capacidade de afetar a membrana das células (COLOMBI; ZANONI; TAVARES, 2018). A maior média foi determinada para o tratamento com HMF, com produção próxima a  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol.

Os tratamentos com componentes ácidos em sua composição, demonstraram médias menores do que os derivados de furanos, com um pico de  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$  em diferentes momentos. De modo semelhante ao já descrito, a presença do ácido fórmico resultou em menor produção de etanol, assemelhando-se à quantidade produzida pelos demais ácidos estudados. A maior produção de glicerol e/ou não metabolização dos açúcares pode ser consequência do menor rendimento.

**Figura 16** - Desdobramento da interação entre inibidores e tempo para a Concentração de Glicerol obtida para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação.



Letras minúsculas comparam os tempos dentro de cada inibidor e letras maiúsculas comparam inibidores dentro de cada tempo

**Fonte:** autoria própria.

Através da Tabela 10 verifica-se o efeito dos inibidores sobre o rendimento do etanol, tendo como base o consumo de substrato. Da análise dos resultados, observa-se menor rendimento na presença dos inibidores, principalmente para o ácido fórmico, que apresentou rendimento muito baixo comparado aos demais tratamentos, havendo maior proximidade dos valores determinados para o tratamento controle. Entretanto, a análise individual dos inibidores mostra, que alguns tratamentos apresentaram rendimento maior para determinados tempos. O HMF no tempo 24 horas da dose 3,0 g.L<sup>-1</sup> e as 6 horas na dose 4,0 g.L<sup>-1</sup> que apresentou rendimento maior que o controle. O mesmo ocorreu com o ácido fênico, que na dose de 3,0 g.L<sup>-1</sup> demonstrou valores superiores para o tempo de 12 e 24 horas, com maiores rendimentos.

Verifica-se que não houve diferença estatística para produção de glicerol dos tratamentos, mesmo que hajam médias maiores desse produto na presença de inibidores. Para produção de etanol, observou-se a diminuição da concentração ao longo do processo fermentativo.

**Tabela 10** - Resultados médios e desvio padrão obtidos para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de Furfural, Hidroximetilfurfural (HMF), Ácido Fênico, Ácido Levulínico e Ácido Fórmico isolados para rendimento de produto (etanol) baseado no consumo de substrato (YP/s)

| Doses<br>(g.L <sup>-1</sup> ) | Tempo <sup>a</sup> | Y <sub>P/S</sub><br>(g.g <sup>-1</sup> )* |                |                |                  |                |
|-------------------------------|--------------------|---|----------------|----------------|------------------|----------------|
|                               |                    | Furfural                                  | HMF            | Ácido fênico   | Ácido levulínico | Ácido fórmico  |
| Controle                      | 6h                 | 0,1815 ±0,0015                            | 0,1815 ±0,0015 | 0,1815 ±0,0015 | 0,1815 ±0,0015   | 0,1815 ±0,0015 |
|                               | 12h                | 0,1221 ±0,0015                            | 0,1221 ±0,0015 | 0,1221 ±0,0015 | 0,1221 ±0,0015   | 0,1221 ±0,0015 |
|                               | 24h                | 0,1129 ±0,0013                            | 0,1129 ±0,0013 | 0,1129 ±0,0013 | 0,1129 ±0,0013   | 0,1129 ±0,0013 |
| 3,0                           | 6h                 | 0,1449 ±0,0024                            | 0,1735 ±0,0021 | 0,1651 ±0,0023 | 0,1176 ±0,0020   | 0,0683 ±0,0015 |
|                               | 12h                | 0,1595 ±0,0030                            | 0,1377 ±0,0020 | 0,1825 ±0,0024 | 0,1439 ±0,0021   | 0,0478 ±0,0015 |
|                               | 24h                | 0,1468 ±0,0021                            | 0,1269 ±0,0020 | 0,2001 ±0,0024 | 0,1559 ±0,0021   | 0,0486 ±0,0015 |
| 3,5                           | 6h                 | 0,1506 ±0,0022                            | 0,2228 ±0,0022 | 0,1368 ±0,0021 | 0,1698 ±0,0021   | 0,0566 ±0,0014 |
|                               | 12h                | 0,1281 ±0,0020                            | 0,1416 ±0,0022 | 0,1896 ±0,0020 | 0,1337 ±0,0021   | 0,0565 ±0,0015 |
|                               | 24h                | 0,1385 ±0,0022                            | 0,1151 ±0,0021 | 0,1745 ±0,0020 | 0,1537 ±0,0022   | 0,0532 ±0,0015 |
| 4,0                           | 6h                 | 0,1622 ±0,0016                            | 0,1640 ±0,0031 | 0,2114 ±0,0021 | 0,1171 ±0,0023   | 0,0803 ±0,0015 |
|                               | 12h                | 0,1373 ±0,0018                            | 0,1793 ±0,0024 | 0,1501 ±0,0021 | 0,1337 ±0,0017   | 0,0563 ±0,0016 |
|                               | 24h                | 0,1269 ±0,0018                            | 0,1680 ±0,0023 | 0,1538 ±0,0018 | 0,1614 ±0,0022   | 0,0570 ±0,0016 |

\*Foram usados os intervalos iniciais e finais para biomassa e substrato (glicose + xilose).

**Fonte:** autoria própria.

#### 4.8 Efeito dos inibidores em associação nos produtos

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos para produção de etanol e glicerol a partir de diferentes tratamentos. Da análise destes, verifica-se o efeito dos produtos dos inibidores isolados, assim como maior variação nas médias para produção de etanol, além de diferenças significativas na produção de seu coproduto glicerol. Observa-se coeficiente de variância elevado para o glicerol, e baixo para o etanol.

Os dados confirmam que a presença do ácido fórmico em maior dose resultou em efeito negativo na produção de etanol, biomassa e consumo de substrato. Relatos de Vanmarcke et al., (2021) avaliando por 72 horas o processo fermentativo, com adição de 3,0 e 6,0 g/L de furfural, verificaram que houve inibição da fermentação e redução de produção de etanol de 34 a 51% e 77 a 86% respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo, nos quais foram adicionados 4,0g.L<sup>-1</sup> de furfural, obteve-se redução de 10,6%. Ribeiro (2019), estudando a mesma cepa, demonstrou que a *Pichia membranifaciens* tem habilidade para metabolizar o etanol presente no meio, produzido a partir do consumo completo da glicose. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o etanol pode ter sido consumido para a produção de ácido acético. As células são capazes de produzir energia através da metabolização do etanol, além da produção continuada deste proveniente da xilose.

O tratamento com a menor concentração de etanol foi o 7, como esperado, pois este em questão tem a presença de todos os inibidores nas maiores doses. Por outro lado, a maior média obtida foi para o tratamento 6, onde as menores doses foram para o ácido fênico e fórmico, mesmo na presença dos outros inibidores em maiores doses. Novamente, os tratamentos na presença do ácido fórmico foram os mais prejudicados em relação à produção do álcool etílico.

Estas diferenças ficam mais evidentes através da Figura 18., permitindo avaliar as médias de concentração de etanol em cada tempo avaliado. Para o tratamento 1, que foi constituído com a maior média de ácido fórmico, verificou-se concentração de 4,38 g.L<sup>-1</sup> às 6 horas do processo fermentativo, representando valor 25% menor que o controle, chegando a 50% menor que os valores apresentados para os tratamentos de 3, 4, 5 e 6, que atingiram concentração de etanol de 9,14 g.L<sup>-1</sup>.

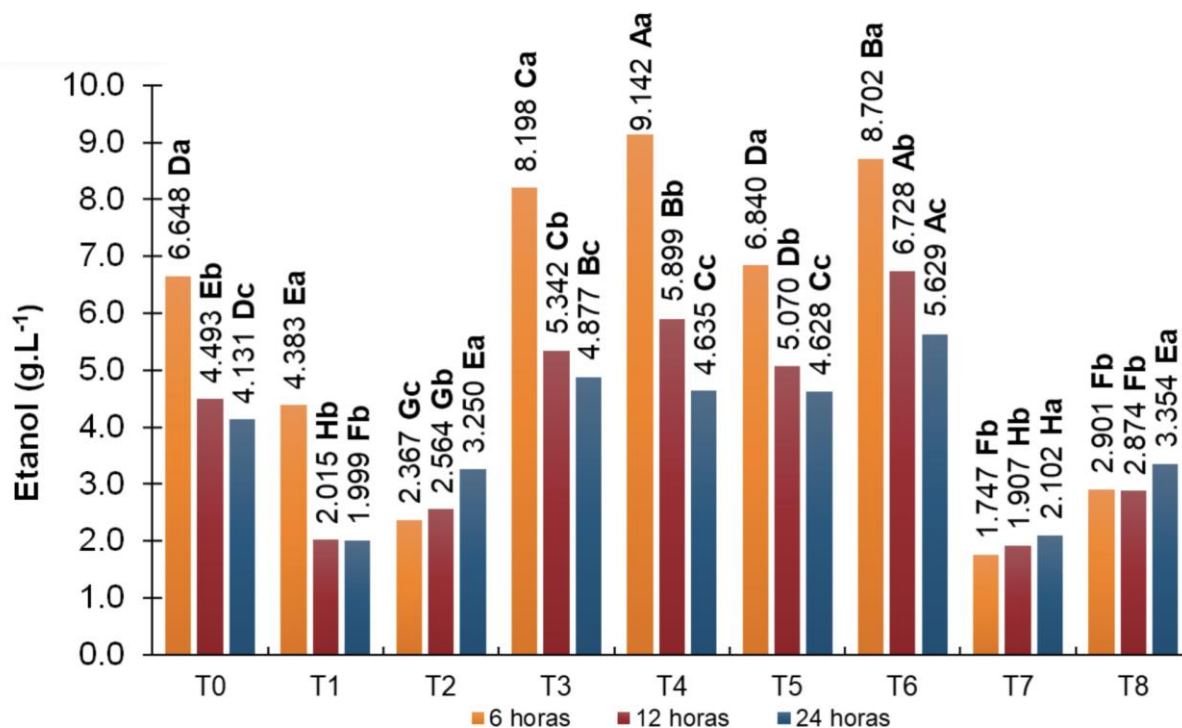
**Tabela 11** - Resultados médios, análise de variância e teste de Tukey para a concentração de etanol e glicerol em g.L<sup>-1</sup> produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses dos inibidores em associação, sendo: Furfural(FUR), Hidroximetilfurfural(HMF), Ácido Fênico(AFE), Ácido Levulínico(ALE) e Ácido Fórmico(AFO) durante 24 horas

| Tratamentos  | Etanol (g.L <sup>-1</sup> ) | Glicerol (g.L <sup>-1</sup> ) |
|--|-----------------------------|-------------------------------|
| <b>Combinações (Fator A)</b>                       |                             |                               |
| Controle negativo                                  | 5,091 e                     | 0,280 bc                      |
| Tratamento 1<br>FUR(+) HMF(-) AFE(+) ALE(-) AFO(+) | 2,799 g                     | 0,365 b                       |
| Tratamento 2<br>FUR(-) HMF(+) AFE(-) ALE(-) AFO(+) | 2,727 g                     | 0,194 c                       |
| Tratamento 3<br>FUR(-) HMF(-) AFE(+) ALE(+) AFO(-) | 6,139 c                     | 0,356 b                       |
| Tratamento 4<br>FUR(-) HMF(+) AFE(+) ALE(-) AFO(-) | 6,558 b                     | 0,293 bc                      |
| Tratamento 5<br>FUR(+) HMF(-) AFE(-) ALE(-) AFO(-) | 5,512 d                     | 0,528 a                       |
| Tratamento 6<br>FUR(+) HMF(+) AFE(-) ALE(+) AFO(-) | 7,020 a                     | 0,510 a                       |
| Tratamento 7<br>FUR(+) HMF(+) AFE(+) ALE(+) AFO(+) | 1,919 h                     | 0,336 b                       |
| Tratamento 8<br>FUR(-) HMF(-) AFE(-) ALE(+) AFO(+) | 3,043 f                     | 0,238 bc                      |
| Teste F  | 441,90**                    | 16,53**                       |
| D.M.S.   | 0,1374                      | 0,1323                        |
| <b>Tempos (Fator B)</b>                            |                             |                               |
| 6 horas  | 5,658 a                     | 0,370 a                       |
| 12 horas   | 4,100 b                     | 0,345 a                       |
| 24 horas   | 3,845 c                     | 0,318 a                       |
| Teste F  | 347,16**                    | 2,62 ns                       |
| D.M.S.   | 0,1374                      | 0,0563                        |
| Interação A x B                                    | 390,27**                    | 8,27**                        |
| C.V.   | 1,5595204                   | 19,772029                     |

\*\*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. A x B = Efeito da interação entre Fator A e Fator B. (+1) = maior dose suportada pelas leveduras de 1,0 g.L<sup>-1</sup>. (-1) = segunda maior dose suportada pelas leveduras 0,6 g.L<sup>-1</sup>.

**Fonte:** autoria própria.

**Figura 18** - Efeito da interação do fator A (inibidor) e fator B (tempo) na concentração de etanol obtida para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação em associação.



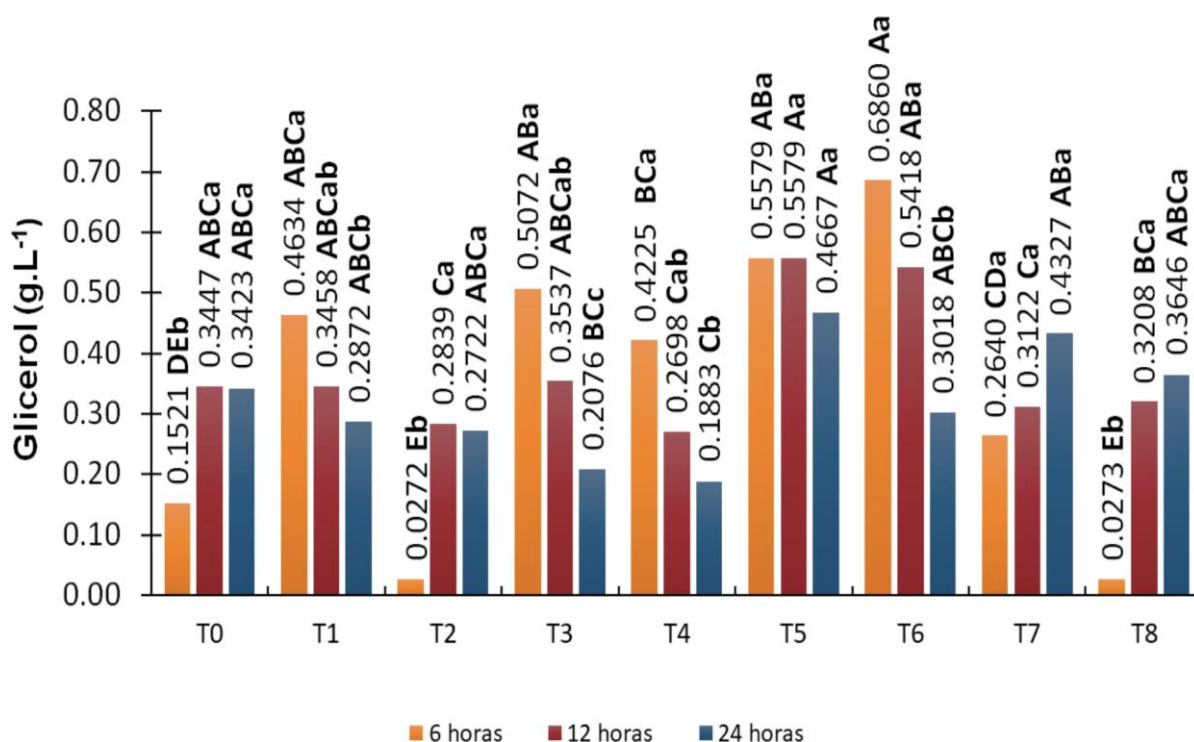
Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada tratamento e letras maiúsculas comparam tratamentos dentro de cada tempo

**Fonte:** autoria própria.

Os tratamentos com ácido fórmico em sua maior dose também apresentaram tendência diferente para a produção de etanol, se comparado a outros tratamentos. Pode-se observar também aumento na concentração média de etanol ao longo do processo fermentativo.

A Figura 19 apresenta o efeito dos inibidores relacionados com a produção de Glicerol, ao longo do processo fermentativo, desenvolvido durante 24 horas. Da análise dos resultados pode-se observar grande variação entre os teores determinados deste coproduto, de modo semelhante ao apresentado para a produção de etanol (Figura 18). Este comportamento pode ser explicado graças a ação negativa dos compostos inibidores que foram adicionados aos mostos para o processo fermentativo. Estes afetaram de modo direto a fisiologia da levedura e consequentemente o processo fermentativo.

**Figura 19** - Efeito da interação do fator A (inibidor) e fator B (tempo) na concentração de glicerol obtida para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses de inibidores de fermentação em associação.



Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada tratamento e letras maiúsculas comparam tratamentos dentro de cada tempo

**Fonte:** autoria própria.

Analisando-se a Tabela 12, verifica-se resultados para rendimento da produção de etanol ao longo das 24 horas em que se desenvolveu o processo fermentativo. Observa-se que para os tratamentos com a presença do ácido fórmico (1, 2, 7 e 8), os rendimentos foram mais baixos, chegando a ser mais de 50% menores que o controle. Para os demais tratamentos, o comportamento foi variável, com tendências para aproximação do tratamento controle (5), ou em apresentar valores superiores (3, 4, e 6), sendo que para o tratamento 4 foram determinadas as maiores médias.

Os inibidores tiveram efeito negativo sobre a fisiologia da levedura no processo fermentativo, em função dos danos provocados sobre as membranas, levando a morte celular, inibição dos brotamentos e viabilidade dos brotos. O ácido fórmico foi o inibidor que apresentou os efeitos mais intensos e as maiores reduções.

Neste contexto, pode-se concluir que a cepa LJ04 de *Pichia membranifaciens* foi capaz de metabolizar pentoses, proporcionando produção

**Tabela 12** - Resultados médios e desvio padrão obtidos para *Pichia membranifaciens* LJ04 em ensaios fermentativos com doses em associação Furfural (FUR), Hidroximetilfurfural (HMF), Ácido Fênico (AFE), Ácido Levulínico (ALE) e Ácido Fórmico (AFO) para rendimento de produto (etanol) baseado no consumo de substrato ( $Y_{p/s}$ )

| Tratamentos  | Tempo    | $Y_{p/s}$ ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )* |
|--|----------|---|
| Controle negativo                                  | 6 horas  | 0,1815 $\pm$ 0,0015                         |
|  | 12 horas | 0,1221 $\pm$ 0,0015                         |
|  | 24 horas | 0,1129 $\pm$ 0,0013                         |
| Tratamento 1<br>FUR(+) HMF(-) AFE(+) ALE(-) AFO(+) | 6 horas  | 0,0897 $\pm$ 0,0014                         |
|  | 12 horas | 0,0413 $\pm$ 0,0012                         |
|  | 24 horas | 0,0409 $\pm$ 0,0014                         |
| Tratamento 2<br>FUR(-) HMF(+) AFE(-) ALE(-) AFO(+) | 6 horas  | 0,0556 $\pm$ 0,0015                         |
|  | 12 horas | 0,0602 $\pm$ 0,0017                         |
|  | 24 horas | 0,0763 $\pm$ 0,0017                         |
| Tratamento 3<br>FUR(-) HMF(-) AFE(+) ALE(+) AFO(-) | 6 horas  | 0,2447 $\pm$ 0,0021                         |
|  | 12 horas | 0,1594 $\pm$ 0,0020                         |
|  | 24 horas | 0,1456 $\pm$ 0,0022                         |
| Tratamento 4<br>FUR(-) HMF(+) AFE(+) ALE(-) AFO(-) | 6 horas  | 0,3034 $\pm$ 0,0022                         |
|  | 12 horas | 0,1958 $\pm$ 0,0023                         |
|  | 24 horas | 0,1538 $\pm$ 0,0023                         |
| Tratamento 5<br>FUR(+) HMF(-) AFE(-) ALE(-) AFO(-) | 6 horas  | 0,1905 $\pm$ 0,0021                         |
|  | 12 horas | 0,1412 $\pm$ 0,0020                         |
|  | 24 horas | 0,1289 $\pm$ 0,0019                         |
| Tratamento 6<br>FUR(+) HMF(+) AFE(-) ALE(+) AFO(-) | 6 horas  | 0,2453 $\pm$ 0,0020                         |
|  | 12 horas | 0,1896 $\pm$ 0,0018                         |
|  | 24 horas | 0,1586 $\pm$ 0,0020                         |
| Tratamento 7<br>FUR(+) HMF(+) AFE(+) ALE(+) AFO(+) | 6 horas  | 0,0353 $\pm$ 0,0014                         |
|  | 12 horas | 0,0385 $\pm$ 0,0016                         |
|  | 24 horas | 0,0424 $\pm$ 0,0013                         |
| Tratamento 8<br>FUR(-) HMF(-) AFE(-) ALE(+) AFO(+) | 6 horas  | 0,0653 $\pm$ 0,0015                         |
|  | 12 horas | 0,0647 $\pm$ 0,0014                         |
|  | 24 horas | 0,0755 $\pm$ 0,0016                         |

\*Foram usados os intervalos iniciais e finais para biomassa e substrato (glicose + xilose).

Fonte: autoria própria.

satisfatória de etanol mesmo com grande morte celular ao final do processo fermentativo. Verifica-se que esta cepa de levedura apresenta patrimônio genético que poderá contribuir muito para a produção de E2G. O emprego de microrganismo que apresenta habilidade para metabolizar pentoses, viabiliza a utilização de resíduos lignocelulósicos como matéria-prima, num contexto de economia, sustentabilidade e economia circular.

Para tanto a realização de novas pesquisas devem ser realizadas buscando subsidiar novos estudos sobre o desempenho fermentativo da cepa LJ04 em condições de estresse induzido por inibidores da fermentação.

Estas informações valiosas e inéditas contribuem a compreensão dos mecanismos de tolerância e sensibilidade da levedura a estes compostos tóxicos, podendo subsidiar o desenvolvimento de estratégias de otimização de processos na produção de etanol de segunda geração.

## 5. CONCLUSÕES

Considerando-se os objetivos propostos e a metodologia empregada pode-se concluir:

- ✓ A cepa LJ04 da levedura *Pichia membranifaciens* tolerou concentrações dos inibidores furfural, HMF, ácidos fênico e levulínico, de forma isolada, ou em combinação nas doses de 3,0 a 3,5g.L<sup>-1</sup>;
- ✓ O ácido fórmico foi o inibidor que provocou maiores danos à fisiologia da levedura e produção de etanol, isolado ou em combinação, a partir de 3,0 g.L<sup>-1</sup>;
- ✓ O ácido fórmico influenciou negativamente a viabilidade celular, brotamentos e viabilidade de brotos, em todas as doses estudadas, levando a sobra de açúcares após 24 horas, que não foram metabolizados e baixos rendimentos do processo fermentativo e da produção de etanol;
- ✓ A LJ04 apresentou consumo de Xilose, com tendência de maior transformação do açúcar na presença de ácido fênico e ácido levulínico;
- ✓ A produção e o rendimento de etanol foram maiores para os tratamentos com adição de ácido fênico;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida JRM, Wiman M, Heer D, Brink DP, Sauer U, Hahn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF (2023) Physiological and Molecular Characterization of Yeast Cultures Pre-Adapted for Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysate. **Fermentation** 9(1):1-20.

Alvim AM, Hoppe L (2016) Potencial de oferta de créditos negativos de carbono a partir do mercado de etanol no Brasil. **Espacios** 37(15):09.

Ansanelli S, Sena PP, Campos DAC de, Silva, GR da (2017) Sistemas de Inovação Ambiental em Países em Desenvolvimento: uma discussão a partir do desenvolvimento do Etanol de Segunda Geração no Brasil. **Revista Pesquisa & Debate** 28(1):121-139.

Arantes JT (2018) **Descoberta na Amazônia enzima-chave para obtenção do etanol de segunda geração**. São Paulo: Agência FAPESP. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/descoberta-na-amazonia-enzima-chave-para-obtencao-do-etanol-de-segunda-geracao/27778/>. Acesso em: 20 mar. 2022.

Astuti RI, Nurhayati N, Ukit, Alifiyanti S, Sunarti TC, Meryandini A (2018) Exogenous L-proline Increases Stress Tolerance of Yeast *Pichia kudriavzevii* Against Inhibitors in Lignocellulose Hydrolysates and Enhances its Ethanol Production. **Earth and Environmental Science** 197:01-08.

Balat M (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy conversion and management** 52(2):858-875.

Barbosa JC, Maldonado Junior W (2015) **Experimentação Agronômica & AgroEstat**. FUNEP: Jaboticabal.

Benítez-Cabello A, Romero-Gil V, Rodríguez-Gómez F, Garrido-Fernández A, Jiménez-Díaz R, Arroyo-López FN (2015) Evaluation and identification of polymicrobial biofilms on natural green Gordal table olives. **Antonie van Leeuwenhoek** 108:597-610.

BP: Statistical Review of World Energy (2022) [conjunto de dados].

Cambi RC, Silva EC da, Martins RV, Junger AP, Guerra SMG (2017) Produção de etanol de 2ª geração a partir de materiais lignocelulósicos. **Revista de Casos e Consultoria** 8(1):e813-e813.

Candido RG, Mori NR, Gonçalves AR (2019) Sugarcane straw as feedstock for 2G ethanol: Evaluation of pretreatments and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products** 142: 01-06.

Chandel AK, Kapoor RK, Singh A, Kuhad RC (2007) Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology** 98(10):1947-1950.

Colombi BL; Zanoni PRS, Tavares LBB (2018) Effect of phenolic compounds on bioconversion of glucose to ethanol by yeast *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. **The Canadian Journal of Chemical Engineering** 96(7):1444-1450.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (2019) **Acompanhamento da safra brasileira grãos, safra 2018/19**. Brasília, setembro 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3042-fechamento-da-safra-2018-2019-aponta-producao-recorde-de-graos-estimada-em-242-1-milhoes-de-t> . Acesso em: 20 mar. 2020.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (2024) **Acompanhamento da safra brasileira grãos, safra 2023/24 Quarto levantamento**. Brasília, abril 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5489-producao-de-cana-de-acucar-na-safra-2023-24-chega-a-713-2-milhoes-de-toneladas-a-maior-da-serie-historica>. Acesso em: 20 jan. 2024.

Cottier F, Tan ASM, Chen J, Lum J, Zolezzi F, Poidinger M, Pavelka n (2015) The transcriptional stress response of *Candida albicans* to weak organic acids. **G3: Genes, Genomes, Genetics** 5(4):497-505.

Díaz-Nava LE (2017) Effect of carbon sources on the growth and ethanol production of native yeast *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 isolated from Sweet sorghum juice. **Bioprocess Biosyst Engineering** 40:1069-1077.

Dussán KJ, Silva DDV, Perez VH, Silva SS da (2016) Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. **Renewable Energy** 87:703-710.

Empresa de Pesquisa Energética (EPE) (2022) **Balanco Energético Nacional (BEN) 2022: Ano Base 2021**. [S.l.]: 2022. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dadosabertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2022>. Acesso em: 12 jun. 2022.

Farinas CS (2021) **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, p.8-13.

FERMENTEC. **Fermentação com Alta Eficiência**. Conferencia – curso 2010. Piracicaba, SP. Brasil. 2010.

Fukumoto A, Kim YP, Matsumoto A, Takahashi Y, Suzuki M, Onodera H, Tomoda H, Matsui H, Hanaki H, Iwatsuki M, Ōmura S, Shiomi K (2017) Naphthacemycins, novel circumventors of  $\beta$ -lactam resistance in MRSA, produced by *Streptomyces* sp. KB-3346-5. I. The taxonomy of the producing strain, and the fermentation, isolation and antibacterial activities. **The Journal of Antibiotics** 70(5):562-567.

Gava AJ, Da Silva CAB, Frias JRG (Eds) (2008) **Tecnologia de alimentos - Princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, p. 116.

Govindaswamy S, Vane LM (2007) Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. **Bioresource Technology** 98:677-685.

Gramiscia BR, Lutz MC, Lopes CA, Sangorrina MP (2018) Enhancing the efficacy of yeast biocontrol agents against postharvest pathogens through nutrient profiling and the use of their additives. *Biological Control*, 121: 151-158.

Grounta A, Doulgeraki AI, Nychas GE, Panagou EZ (2016) Biofilm formation on *Conservolea* natural black olives during single and combined inoculation with a functional *Lactobacillus pentosus* starter culture. **Food Microbiology** 56: 35-44.

Gutierrez, LE (1988) Efeito dos ácidos fórmico e propiônico sobre a produção de alcóois superiores durante a fermentação alcoólica. **Anais ESALQ**, 45(parte 2):369-379.

Hahn-hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca F, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund MF (2007) Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied microbiology and biotechnology** 74:937-953.

Hernández-Pérez AF, De Arruda PV, Felipe MGA (2016) Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Brazilian Journal of Microbiology** 47:489-496.

Hoskins B, Lyons M (2009) Improving bioethanol yield: the use of solid-state fermentation products grown on DDGS. **Journal of the Institute of Brewing** 115(1):64-70.

Ingraham, JL; Guymon, JF (1960) The formation of higher aliphatic alcohols by mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 88: 157-66.

Johnson EA, Echavarri-Erasun C (2011) Yeast biotechnology. In: **The yeasts**. Elsevier. p.21-44.

Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant N (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels** 6:1-10.

Koppram R, Tomas-Pejó E, Xiros C, Olsson L (2014) Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. **Trends in Biotechnology** 32(1):46-53.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (2011) **The yeasts, a taxonomic study**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier. 2354 p.

Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences.

Lee SS, Robinson FM, Wang HY (1981) Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium** 11:641-649.

Macrelli S, Galbe M, Wallberg O (2014) Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. **Biotechnology for Biofuels** 7:1-16.

Maia LC et al. (2015) Diversity of Brazilian fungi. **Rodriguésia** 66(4):1033-1045.

Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, Sawayama S (2009) Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology** 84: 37–53.

McMillan JD (1993) **Xylose Fermentation Ethanol**: a review. Springfield: National Technical Information Service.

Moreno AD, Carbone A, Pavone R, Olsson L, Geijer C (2019) Evolutionary engineered *Candida intermedia* exhibits improved xylose utilization and robustness to lignocellulose-derived inhibitors and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology** 103:1405-1416.

Park PK, Cho DH, Chu KH (2005) Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 21:429-434, 2005.

Pavani CD et al. (2013) Efeito da concentração de N, P, Mg, Mn e Zn sobre a fisiologia da levedura em fermentação. **Ciência & Tecnologia** 5.

Pereira SC, Maehara L, Machado CMM, Farinas, CS (2015) 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels** 8:1-16.

Ribeiro NN Caracterização das condições fermentativas da levedura *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração - Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Unesp, Jaboticabal 2019.

Ribeiro NN, Freita LA, Tralli FL, Silva AF, Freita CM, Mendes FQ, Teixeira V, Junior CNS, Mutton MJR (2019) Otimização das condições fermentativas de *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração. **Química Nova** 42(7):720-728.

Rudolf A, Baudel H, Zacchi G, Hahn-Hägerdal B, Lidén G (2008) Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. **Biotechnology and Bioengineering** 99(4):783-790.

Rumbold K, Buijsen HJJ, Overkamp KM, Groenestijn JW, Punt PJ, Werf MJ (2009) Microbial production host selection for converting second-generation feedstocks into bioproducts. **Microbial Cell Factories** 8:1-11.

Ruyters S, Mukherjee V, Verstrepen KJ, Thevelein JM, Willems KA, Lievens B (2015) Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** 42:39-48.

Schmidell W, Lima U de A, Aquarone E, Borzani W (2001) **Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica**. Editora Blucher 560p.

Silva AF (2019) **Avaliação do potencial de leveduras fermentadoras de pentoses na produção de etanol 2G, a partir de bagaço de sorgo**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Unesp, Jaboticabal, 2019.

Stefanini I, Albanese D, Cavazza A, Franciosi E, De Filippo C, Donati C, Cavalieri D (2016) Dynamic changes in microbiota and mycobiota during spontaneous 'Vino Santo Trentino' fermentation. **Microbial Biotechnology** 9(2):195–208.

Šuranská H, Vránová D, Omelková J, Vadkertiová R (2012) Monitoring of yeast population isolated during spontaneous fermentation of Moravian wine. **Chemical Papers** 66: 861-868.

Tomas-Pejo, E, Alvira, P, Ballesteros, M, Negro, MJ. **Tecnologias de pré-tratamento para conversão de lignocelulose em bioetanol**. Biocombustíveis (pp.149-176). Elsevier Inc. DOI: [10.1002/9780470754108](https://doi.org/10.1002/9780470754108)

Van Dijk M, Erdei B, Galbe M, Nygard Y, Olsson L, Strain-dependent variance in short-term adaptation effects of two xylose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource technology**. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121922>.

Vanmarcke G, Demeke MM, Foulquié-Moreno MR, Trevelien JM (2021) Identification of the major fermentation inhibitors of recombinant 2G yeasts in diverse lignocellulose hydrolysates. **Biotechnology for Biofuels** 14:1-15.

Varize CS, Cadete RM, Lopes LD, Christofoleti-Furlan RM, Lachance M, Rosa CA, Basso LC (2018) *Spathaspora piracicabensis* f. a., sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek** 111: 525-531.

Wang J, Wang HY, Xia XM, Li PP, Wang KY (2013) Synergistic effect of *Lentinula edodes* and *Pichia membranifaciens* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. **Postharvest Biology and Technology** 81: 7–12.

Wang S, Cheng G, Joshua C, He Z, Sun X, Li R, Liu L, Yuan Q (2016) Furfural tolerance and detoxification mechanism in *Candida tropicalis*. **Biotechnology for Biofuels** 9(1):1-11.

Wu Q, Chen L, Xu Y (2013) Yeast community associated with the solid state fermentation of traditional Chinese Maotai-flavor liquor. *International Journal of Food Microbiology*, 166: 323-330.

Yamakawa CK, Kastell L, Mahler MR, Martinez JL, Mussatto SI (2020) Exploiting new biorefinery models using non-conventional yeasts and their implications for sustainability. **Bioresource Technology** 309:123374, 2020.

Yang Y, Hu M, Tang Y, Geng B, Qiu M, He Q, Chen S, Wang X, Yang S (2018) Progress and perspective on lignocellulosic hydrolysate inhibitor tolerance improvement in *Zymomonas mobilis*. **Bioresources and Bioprocessing** 5(1):1-12.

You L, Wang S, Zhou R, Hu X, Chu Y, Wang T (2016) Characteristics of yeast flora in Chinese strong-flavoured liquor fermentation in the Yibin region of China. **Journal of The Institute of Brewing** 122: 517-523.

Zhou YH, Ming J, Deng LL, Zeng KF (2014) Effect of *Pichia membranifaciens* in combination with salicylic acid on postharvest blue and green mold decay in citrus fruits, **Biological Control** 74: 21-29.

Zuurbier, PJP, J. van de Vooren, 2008. Sugarcane ethanol: contributions to climate change mitigation and the environment, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherland.