

**AVALIAÇÃO DA ACLIMATAÇÃO DE *Pichia stipitis* AO
HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE
CANA E HIERARQUIZAÇÃO DA TOXICIDADE DOS
INIBIDORES CELULARES.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos

Felipe Peres Oliveira

Orientador: Prof. Nei Pereira Jr., *PhD*

Rio de Janeiro

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos

Felipe Peres Oliveira

**AVALIAÇÃO DA ACLIMATAÇÃO DE *Pichia stipitis*
AO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO
DE CANA E HIERARQUIZAÇÃO DA TOXICIDADE
DOS INIBIDORES CELULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários
para a obtenção do grau em Mestre em
Ciências (*MSc*).

Orientador
Professor Nei Pereira Jr., *PhD*

Rio de Janeiro
2010

AVALIAÇÃO DA ACLIMATAÇÃO DE *Pichia stipitis* AO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA E HIERARQUIZAÇÃO DA TOXICIDADE DOS INIBIDORES CELULARES

Felipe Peres Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau em Mestre em Ciências (*MSc*).

Aprovada por:

Prof. Nei Pereira Jr., *PhD* (Orientador/Presidente)

Prof.^o Allen Norton Hagler, *DSc*

Prof.^a Maria Antonieta P. Gimenes Couto, *DSc*

Prof.^a Rosalie Reed Rodrigues Coelho, *DSc*

O48a Oliveira, Felipe Peres.

Avaliação da aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares/Felipe Peres Oliveira. – 2010.

XX, 143 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

Orientador: Nei Pereira Jr.

1. Bagaço de cana. 2. *Pichia stipitis*. 3. Aclimação. 4. Etanol. 5. Inibidores celulares – Teses. I. Pereira Jr., Nei (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. III. Título.

CDD: 665.776

"A sabedoria é a única riqueza que os tiranos não podem expropriar."

[Khalil Gibran](#)

À minha família Rose, Italo, Fabiano, Graziela e Mariana,
Dedico este Trabalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, a quem tudo se deve;

Ao Professor Nei Pereira Jr., pelos ensinamentos, paciência e exemplo de dedicação e amor ao que faz. Nada escapa destes olhos....

Ao amigo Nei, pelos conselhos e incentivos pessoais;

Ao Ítalo, meu pai e amigo, por ser um homem incorruptível e maior exemplo de dedicação à família e de perseverança aos seus objetivos profissionais e pessoais que eu poderia ter.

À Rose Mayre, minha mãe e amiga, por simplesmente nunca desistir e sempre crer que é possível...

Ao meu irmão Fabiano, antes de tudo um amigo confiável para todas as horas, sua esposa Graziela pela doçura e paciência e a pequena Mariana, que com um único sorriso alegra o mais triste de nossos dias;

Ao Gabriel Betancur, pelo companherismo, paciência, boa vontade e prestatividade sem fim em me ajudar e sempre me socorrer quando eu não sabia o que fazer no laboratório. Sem sua ajuda eu não teria concluído este trabalho.

À Carolina Barcelos, companheira e amiga por simplesmente ser "tanta" demais e alegrar o ambiente de trabalho e vida pessoal. Um exemplo de dedicação ao que faz, perseverança e humildade. Sem esquecer é claro das ajudas gráficas e estéticas.

Às estagiárias Ludmylla e Daiane pelo aporte experimental;

Aos colegas do laboratório, por tornarem o ambiente agradável, especialmente Neumara e Mariana Mello, pela alegria inesgotável e "pérolas" do dia-a-dia.

Ao CNPq e Petrobrás pelo auxílio financeiro.

AVALIAÇÃO DA ACLIMATAÇÃO DE *Pichia stipitis* AO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA E HIERARQUIZAÇÃO DA TOXICIDADE DOS INIBIDORES CELULARES

Resumo da Dissertação de M.Sc. apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Brasil.

Felipe Peres Oliveira

Orientador: Nei Pereira Jr.

O bagaço de cana, material lignocelulósico, é produzido no Brasil atualmente em quantidades superiores a 150 milhões de toneladas por ano, representando uma importante fonte de açúcares fermentáveis como xilose, presente no hidrolisado hemicelulósico obtido através do pré-tratamento ácido. Todavia, a presença de inibidores celulares provenientes deste processo mostra-se como um obstáculo para a utilização eficiente da xilose oriunda do hidrolisado. Sendo assim, o presente trabalho objetivou confirmar a necessidade de uma aclimação prévia ao hidrolisado para a obtenção de um processo fermentativo eficiente e explorar este fenômeno metabólico através de repiques sucessivos da linhagem de *P.stipitis* LADEBIO01 em concentrações crescentes de hidrolisado (50%, 60%, 70%, 80% e 90% v/v). Após 40 repiques sucessivos, foi possível reduzir o tempo de fermentação de 40h para 30h, levando a um aumento da produtividade volumétrica de etanol de 0,71 g/L.h, quando as células foram aclimatadas em 2 etapas para 0,84 g/L.h após 40º repique sucessivo em hidrolisado hemicelulósico. Para efeito de comparação, a linhagem original dessa levedura (CBS5774) foi aclimatada em 2 etapas e seu desempenho fermentativo resultou em uma produtividade volumétrica de etanol de apenas 0,19 g/L.h, evidenciando uma provável modificação da levedura ao longo dos anos. Além disso, foi possível hierarquizar a influência negativa dos inibidores celulares, através de técnicas estatísticas, e estabelecer o crescimento celular da linhagem *P.stipitis* LADEBIO01 e a fermentação alcoólica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em concentrações de 18g/L de ácido acético, 900 mg/L de furfural e 300 mg/L de hidroximetilfurfural.

ASSESSMENT OF ACCLIMATIZATION OF HEMICELLULOSIC HYDROLYSATE FROM SUGARCANE BAGASSE BY *Pichia stipitis* AND RANKING OF TOXICITY OF CELLULAR INHIBITORS

Abstract of the M.Sc. Dissertation presented to the graduate program on technology of Chemical and Biochemical Process of the Chemical High School of Federal University of Rio de Janeiro – Bazil.

Felipe Peres Oliveira

Supervisor: Nei Pereira Jr.

Sugarcane bagasse, a lignocellulosic material, is produced nowadays in Brazil in amounts exceeding 150 million tons per year, and represents an important source of fermentable sugars such as xylose, present in the hemicellulosic hydrolysate, obtained after acid pretreatment. However, the presence of cellular inhibitors from this process is shown as an obstacle to the use of xylose arising from this hydrolysate. Therefore, this study aimed at confirming the need of a previous acclimatization in the hydrolysate to obtain an efficient fermentation process and explore this metabolic phenomenon through repeated subcultures in increasing concentrations of hydrolysate (50%, 60%, 70% 80% and 90% v/v) by *P.stipitis* LADEBIO01. After 40 successive subcultures, it was possible to reduce the fermentation time from 40h to 30h, leading to an increase in the volumetric productivity of ethanol from 0.71 g/L.h, with cells acclimated in 2 steps, to 0.84 g/L.h, after 40 successive subculture in the hemicellulosic hydrolysate by this yeast strain. For effect of comparison, the original strain of this yeast (CBS5774) was acclimatized and its fermentative performance resuted in an ethanol volumetric productivity of only 0.19 g/Lh, suggesting a probable change in the yeast over the years. In addition, it was possible to define, through statistical analysis, the hierarchy of the negative influence of cell inhibitors and to establish cell growth and fermentation by *P.stipitis* at concentrations of 18g acetic acid/L, 900 mg furfural/L and 300 mg hydroxymethylfurfural/L.

Sumário

Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	xix
Capítulo 1. Introdução.....	1
Capítulo 2. Revisão Bibliográfica	7
2.1. O Etanol	7
2.1.1. Aplicações do Etanol.....	8
2.2. Panorama e Perspectivas da Produção de Etanol no Brasil.....	10
2.3. Aspectos Sócio-Econômicos do Proalcool.....	14
2.4. Processos para Produção de Etanol	18
2.5. Matérias Primas Utilizadas na Bioprodução de Etanol.....	19
2.5.1. Materiais Lignocelulósicos	20
2.5.2. A Cana-de-Açúcar	22
2.5.3. Bagaço de Cana: Matéria-prima Lignocelulósica por Excelência	23
2.5.4. A Fração Celulósica	24
2.5.5. Lignina	26
2.5.6. A Fração Hemicelulósica.....	27
2.6. Pré-Tratamentos para Materiais Lignocelulósicos	29
2.6.1. Pré-Tratamento Ácido	32
2.6.2. Inibidores do Processo de Fermentação	32

2.6.3. Processo de Destoxificação	35
2.7. Fermentação de Hidrolisados Hemicelulósicos.....	36
2.7.1. Metabolismo da Xilose	37
2.7.2. Microrganismos Fermentadores de Xilose	40
2.7.3. Fatores Ambientais Que Afetam a Fermentação de Xilose.....	42
2.7.3.1. Grau de Aeração.....	42
2.7.3.2. pH.	43
2.7.3.3. Temperatura.	44
2.7.3.4. Concentração de Substrato	44
2.7.3.5. Concentrações de Etanol	45
2.8. Considerações Gerais	46
Capítulo 3. Justificativa e Objetivos.....	48
3.1. Justificativas	49
3.2. Objetivos	50
Capítulo 4. Materiais e Métodos	53
4.1. Microrganismos	53
4.1.2. Manutenção do Microrganismo	55
4.2. Obtenção do Hidrolisado Hemicelulósico	55
4.3. Meios Empregados para Ativação, Propagação e Fermentação	57
4.3.1. Meio de Ativação.....	57
4.3.2. Meios para Propagação Celular	58
4.3.2.1. Meios para Propagação Celular em meio Sintético.	58
4.3.2.2. Meios para Propagação Celular em Hidrolisado	

Hemicelulósico.	59
4.3.3. Meios para Fermentação.	59
4.3.3.1. Meio Sintético.	59
4.3.3.2. Hidrolisado Hemicelulósico.....	60
4.4. Metodologias de Propagação Celular.	60
4.4.1. Meios para Propagação Celular para <i>P.stipitis</i> CBS5774.	60
4.4.2. Meios para Propagação Celular para <i>P.stipitis</i> LADEBIO01 – Melhoramento da linhagem através de aclimações sucessivas.	61
4.5. Fermentação de Hidrolisado Hemicelulósico em Biorreator Instrumentado.	63
4.6. Amostragem.	64
4.7. Métodos Analíticos.....	66
4.7.1. Determinação da Massa Celular.	66
4.7.2. Determinações Quantitativas.	67
4.7.3. Variáveis de Resposta.	68
4.8. Estudo da Influência dos Inibidores Celulares do Hidrolisado Hemicelulósico no Crescimento Celular e na Produção de Etanol para <i>Picha stipitis</i> (LADEBIO01 e CBS5774).....	69
4.8.1. Preparo dos Meios e Adição dos Inibidores.....	71
4.8.2. Estudo do Perfil de Crescimento Celular na Presença de Inibidores Celulares.....	71
4.8.3. Estudo do Perfil da Produção de Etanol na Presença de Inibidores Celulares.....	72
4.8.3.1. Propagação de Células.....	72
4.8.3.2. Fermentação.	72

4.9. Caracterização Molecular das Linhagens de <i>Pichia stipitis</i>	72
4.9.1. Extração de DNA de Leveduras.....	72
4.9.2. Amplificação via PCR da Região D1/D2 do 26s rDNA.	73
4.9.3. Amplificação via PCR da Região espaçadora Intergênica (ITS).....	74
Capítulo 5. Resultados e Discussão	75
5.1. Concentração de Inibidores Celulares Presentes nos Hidrolisados Obtidos em Diferentes Condições de Pré-Tratamento.	75
5.2. Avaliação da Aclimação da <i>P.stipitis</i> LADEBIO01.	76
5.2.1. Avaliação das Concentrações Celulares Cultivadas em Concentrações Crescentes de Hidrolisado.....	76
5.2.2. Avaliação dos Perfis de Fermentação em Função de Vários Graus de Aclimação.	78
5.3. Ensaio de Tolerância aos Inibidores Celulares para Crescimento Celular e Fermentação por LADEBIO01 e CBS5774.	89
5.3.1. Crescimento Celular.....	90
5.3.2. Processo Fermentativo.	97
5.4. Caracterização Molecular das Linhagens de <i>Pichia stipitis</i>	103
5.5. Considerações Gerais.....	104
Capítulo 6. Conclusões e Sugestões	106
6.1. Conclusões.	106
6.2. Sugestões.	107
Capítulo 7. Referências Bibliográficas	109

Lista de Figuras

Figura 2.1. Aplicações do etanol.....	10
Figura 2.2. Ranking dos países produtores de etanol	11
Figura 2.3. Evolução da produção brasileira de álcool	12
Figura 2.4. Evolução da produção brasileira de Cana-de-Açúcar	13
Figura 2.5. Consumo de etanol no Brasil	18
Figura 2.6. Produção brasileira de álcool (m ³) por Região	18
Figura 2.7. Alternativas para a bioprodução de etanol.....	21
Figura 2.8. Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignoceluloso	21
Figura 2.9. Disposição das moléculas de glicose, unidas por ligações glicosídicas (a); Estrutura simplificada da celulose (b).....	25
Figura 2.10. Álcoois precursores de lignina.....	26
Figura 2.11. Estrutura típica da hemicelulose.....	28
Figura 2.12. Produtos potenciais a partir de xilose	37
Figura 2.13. Reação global de conversão de D-xilose a etanol	38
Figura 2.14. Metabolismo de D-xilose em leveduras.....	39
Figura 4.1. Observação Microscópica da Linhagem Flocculante de <i>Pichia stipitis</i> CBS 5774	53
Figura 4.2. Prensa Hidráulica para Extração do Hidrolisado	55

Figura 4.3. Sequência da metodologia empregada para a aclimação da levedura <i>P.stipitis</i> LADEBIO 01	63
Figura 4.4. Diagrama para o processamento das amostras	64
Figura 4.5. Curva de calibração para estipe LADEBIO 01	65
Figura 4.6. Curva de calibração para estipe CBS5774	66
Figura 5.1. Cinética de fermentação em meio sintético por LADEBIO01	79
Figura 5.2. Cinética de fermentação em meio sintético por CBS5774	80
Figura 5.3. Cinética de fermentação em hidrolisado com aclimação prévia em 2 etapas (25% e 50% de hidrolisado) por LADEBIO01	80
Figura 5.4. Cinética de fermentação em hidrolisado com aclimação prévia em 2 etapas (25% e 50% de hidrolisado) por CBS5774	81
Figura 5.5. Cinética de fermentação em hidrolisado com células propagadas em meio sintético (sem aclimação) por LADEBIO01	82
Figura 5.6. Cinética de fermentação em hidrolisado após o 10º repique (células crescidas e propagadas em 25% de hidrolisado) por LADEBIO01	82
Figura 5.7. Cinética de fermentação em hidrolisado após o 20º repique (após o 10º repique as células foram submetidas à cultivos contendo 50% de hidrolisado) por LADEBIO01	84
Figura 5.8. Cinética de fermentação em hidrolisado após o 30º repique sucessivo por LADEBIO01	85
Figura 5.9. Cinética de fermentação em hidrolisado após o 40º repique sucessivo (após o 30º repique foi utilizado 60% de hidrolisado durante 5 passagens e posteriormente 70% nos 5 repiques seguintes) por LADEBIO01	85
Figura 5.10. Perfil de consumo de substrato em fermentações de meio sintético e hidrolisado utilizando células em diferentes condições de propagação	87

Figura 5.11. Perfil de produção de etanol em fermentações de meio sintético e hidrolisado utilizando células em diferentes condições de propagação	88
Figura 5.12. Gráficos de Pareto para crescimento celular de CBS5774 na presença de inibidores celulares de hidrolisado hemicelulósico em 12h(a) e 48h(b)	93
Figura 5.13. Gráficos de Pareto para crescimento celular de LADEBIO01 na presença de inibidores celulares de hidrolisado hemicelulósico em 12h(a) e 48h(b)	94
Figura 5.14. Superfície de Resposta para os efeitos negativos do furfural X ác. acético para a linhagem LADEBIO01	95
Figura 5.15. Superfície de Resposta para os efeitos negativos do furfural X ác. acético para a linhagem CBS5774	96
Figura 5.16 Gráfico de Pareto para produção de etanol para linhagem LADEBIO01 nos tempos de 24h (a) e 48h (b)	99
Figura 5.17. Gráfico de Pareto para produção de etanol para linhagem CBS774 nos tempos de 24h (a) e 48h (b)	101
Figura 5.18 Superfície de resposta da concentração de etanol com variações de HMF e ácido acético para a linhagem LADEBIO01	102
Figura 5.19. Superfície de resposta da concentração de etanol com variações de HMF e ácido acético para a linhagem CBS5774	102

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Características físico-químicas do etanol	8
Tabela 2.2. Exportação e importação de álcool etílico no Brasil	14
Tabela 2.3. Composição lignocelulósica de alguns resíduos agro-industriais.....	22
Tabela 2.4. Constituintes básicos de alguns materiais lignocelulósicos ...	29
Tabela 2.5. Desempenho de microrganismos fermentadores de xilose ...	41
Tabela 4.1. Meio de manutenção	55
Tabela 4.2. Composição do Meio Utilizado para ativação das células.....	57
Tabela 4.3. Composição da solução de sais minerais e ácido cítrico	58
Tabela 4.4. Condições operacionais do cromatógrafo para quantificação de açúcares e metabólicos principais	67
Tabela 4.5. Variáveis e níveis utilizados no estudo de inibição celular	70
Tabela 4.6. Concentração dos inibidores adicionados ao meio sintético ..	70
Tabela 5.1. Concentração dos inibidores celulares.....	76
Tabela 5.2. Concentração celular em concentrações crescentes de hidrolisado hemicelulósico.....	77
Tabela 5.3. Concentração celular em apenas três aclimações em concentrações crescentes de hidrolisado hemicelulósico.....	78
Tabela 5.4. Valores mais relevantes dos processos fermentativos	89
Tabela 5.5. Concentrações celulares da linhagem LADEBIO01 obtidas em meio sintético na presença de diferentes concentrações pré-estabelecidas de inibidores celulares.....	90
Tabela 5.6. Concentrações celulares da linhagem CBS5774 obtidas em meio sintético na presença de diferentes concentrações pré-estabelecidas de inibidores celulares.....	91

Tabela 5.7. Concentração de Xilose e etanol em 24 e 48h de fermentação por <i>P.stipitis</i> LADEBIO01.....	97
Tabela 5.8. Concentração de Xilose e etanol em 24 e 48h de fermentação por <i>P.stipitis</i> CBS5774.....	98

Lista de Siglas e Abreviaturas

°C: graus Celsius;

AEAC: álcool etílico anidro combustível;

AEHC: álcool etílico hidratado combustível;

ANP: Agência Nacional do Petróleo;

API: American Petroleum Institute

atm: atmosfera;

ATP: Adenosina Trifosfato;

CBS: Central Bureau voor Schimmelcultures;

CIMA: Conselho Interministerial do Açúcar e do Álcool;

CNAL: Conselho Nacional do Álcool;

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento;

DNA – Ácido desoxirribonucléico;

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético;

ETBE: éter etílico terc-butílico;

HMF: Hidroxi-metil-furfural;

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance;

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico;

L: Litro;

MAPA: Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento;

mg: miligramas;

min: minutos;

µL: microlitros;

mL: mililitro;

µmol: micromols;

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo;

MTBE: éter metílico terc-butílico;

nm: nanômetros;

P: Concentração Final de Etanol, g.L⁻¹;

pb: Pares de bases;

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico;

PROALCOOL: Programa Nacional do Álcool;

Q_P : produtividade volumétrica em etanol, $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$;
RFA: Renewable fuels association;
rpm: rotação por minuto;
S:L: Sólido:Líquido;
 S_0 : Concentração Inicial de Substrato, g.L^{-1} ;
 t_f : tempo de fermentação, h;.
ton: toneladas;
UNICA: União de Agroindústria Canavieira de São Paulo;
UDOP: União dos Produtores de Bioenergia;
USDA: United States Department of Agriculture;
UV: Ultra Violeta;
V: volts
v/v: relação volume/volume;
vvm: vazão de ar por volume de meio por minuto, min^{-1} ;
X: concentração final de células, g.L^{-1} ;
 X_0 : concentração inicial de células, g.L^{-1} ;
 $Y_{P/S}$: fator de rendimento em produto por substrato consumido, g.g^{-1} ;
 $Y_{X/S}$: fator de rendimento em células por substrato consumido, g.g^{-1} ;

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Avaliando o atual consumo das fontes primárias de energia, pode-se observar que as fontes mais utilizadas, tais como petróleo e carvão mineral, são fontes não renováveis de energia e, desta forma, possuem uma exploração limitada. A partir disso, vários artigos já citam o crescimento de uma forte tendência na substituição da energia de origem fóssil por fontes de energia renováveis, tendo como objetivo, além da busca por novas fontes de energia, minimizar os efeitos negativos causados ao meio ambiente pelo uso excessivo dos combustíveis fósseis (GOLDEMBERG *et al*, 2004; COELHO *et al*, 2006).

Em se tratando do meio ambiente, as fontes renováveis de energia reduzem emissão de gases e, conseqüentemente, colaboram para redução do efeito estufa. Além disso, são tecnologias ecologicamente apropriadas e com incentivos governamentais para a sua difusão (PROINFA - Programa de Incentivo às Fontes Alternativas de Energia Elétrica, Lei 10.438/2002).

Desde a década de 1980 os cientistas passaram a alertar os Governos sobre o fenômeno do aquecimento global, mostrando evidências

cada vez mais convincentes de que a temperatura da Terra estava subindo a uma taxa maior do que a esperada pelos registros históricos, devido a ações do homem; a queima de combustíveis fósseis seria a principal causa desse fenômeno e os níveis de dióxido de carbono na atmosfera, o principal gás de efeito estufa, havia subido de 280 PPM (partes por milhão), índice que prevalecia antes da Revolução Industrial, para 380 PPM nos dias de hoje (MUSTAFA *et al*, 2008).

Diante dessa problemática tem se apresentado um crescente interesse por fontes alternativas de energia, destacando-se os empreendimentos realizados pelo Brasil e Estados Unidos no desenvolvimento de projetos para a produção do biocombustível etanol com base em resíduos agroindustriais oriundos da cana-de-açúcar e do milho, respectivamente. Arelados a esse interesse pelo etanol encontram-se: a indústria automobilística, com vendas crescentes de veículos movidos a álcool e tipo "FLEX" (utilizam qualquer mistura etanol:gasolina); os governos, com diversas regulamentações que aumentam gradativamente o teor de etanol em gasolina; e a indústria de biotecnologia, com enzimas e microrganismos cada vez mais eficientes e visando diminuir o seu custo. A sinergia criada entre esses setores vem aumentando acentuadamente as demandas por novas tecnologias para produção, consumo e pesquisa/desenvolvimento na área dos biocombustíveis.

Além de ser uma alternativa para superar a problemática econômica do mercado energético, especialmente de combustíveis fósseis, o álcool hidratado e a mistura etanol-gasolina apresentam diversas vantagens ambientais. Por exemplo, quando utilizado como combustível, comparado à gasolina, apresenta-se uma redução nas emissões de enxofre, CO₂, particulados e outras substâncias poluentes, como tem sido demonstrado em testes das concessionárias Volkswagen e Ford. Adicionalmente, as reduções nas emissões de CO, hidrocarbonetos e NO_x atingem 57%, 64% e 13%, respectivamente. Cabe destacar que, no caso de combustão

incompleta, o acetaldeído gerado pelo uso do etanol é menos agressivo para a saúde humana e a natureza do que o formaldeído gerado com a utilização da gasolina (SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005; PEREIRA Jr., 1991;).

Cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos no Brasil já são renováveis. No resto do mundo, 86% da energia vêm de fontes energéticas não-renováveis. Pioneiro mundial no uso de biocombustíveis, o Brasil alcançou uma posição almejada por muitos países que buscam fontes renováveis de energia, como alternativas estratégicas ao petróleo.

Especificamente no Brasil, atualmente o segundo maior produtor mundial de açúcar e etanol, processaram na safra de 2008/2009 aproximadamente 572 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, o que gerou em média cerca de 157 milhões de bagaço (MAPA, 2009; CONAB, 2008). Sendo que de 60 a 90% são utilizados para alimentação de caldeiras e, entre 10 a 40% não possuem destinação apropriada. Além disso, empresas especializadas no desenvolvimento de equipamentos para usinas produtoras de etanol, asseguram que com a implementação de estratégias de integração energética e o uso de caldeiras de última geração, o excedente do bagaço poderia atingir a marca de 78% (FAIRBANKS, 2003).

Cabe ressaltar ainda que, utilizar um resíduo como matéria-prima além de desimpactar o meio ambiente, gera uma enorme economia quando tratando-se da obtenção da matéria-prima que chega a representar 2/3 do custo total do processo. Gera ainda economia relacionada ao transporte, onde no caso do bagaço é gerado no mesmo local onde a cana é processada.

O bagaço de cana apresenta-se então como um dos materiais lignocelulósicos com maior potencial para produção de etanol e outros produtos de interesse, dentro do conceito denominado de "Biomass Refinery" ou "Biorrefinaria". Este conceito baseia-se na separação seletiva

das frações do material lignocelulósico de acordo com suas características químicas e/ou dos produtos desejados a serem obtidos. Direcionados por esse conceito, pode se afirmar que a hemicelulose e a celulose, principais frações estruturais do bagaço de cana, representam uma fonte potencial de xilose e glicose, respectivamente. Porém, a obtenção desses açúcares requer a aplicação de técnicas que permitam a sua extração seletiva.

Esta crescente demanda da utilização de fontes alternativas de energia tem suscitado a necessidade do desenvolvimento de biocombustíveis. Tais processos de produção, sobretudo os relacionados à produção de bioetanol, requerem a utilização de microrganismos cada vez mais eficientes e adaptados às condições em que são realizados estes processos, como por exemplo, fermentações que utilizam hidrolisados obtidos do pré-tratamento ácido do bagaço de cana, rico em xilose. Contudo, durante a hidrólise ácida são formados inibidores do crescimento celular e da fermentação da xilose, como o ácido acético, furfural e hidroimetil-furfural, variando suas concentrações de acordo com as condições nas quais estes hidrolisados são processados (BETANCUR, 2005).

A D-xilose pode ser degradada, visando a produção de etanol, por diferentes espécies de bactérias, fungos filamentosos e leveduras naturalmente ocorrente e/ou recombinantes. Entretanto as bactérias possuem baixa tolerância ao etanol e fungos filamentosos possuem baixas produtividades. Entre as leveduras, *P.stipitis* destaca-se por ser uma das melhores produtoras de etanol e, por ser altamente floculante apresenta vantagens para processos de escala Industrial (PEREIRA JR.1991).

Justamente pela presença desses inibidores celulares, estudos anteriores desenvolvidos nos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos da Escola de Química da UFRJ, coordenados pelo professor Nei Pereira Jr., direcionados ao aproveitamento integral do bagaço de cana por via biotecnológica observaram que esta levedura quando submetida a aclimações com concentrações crescentes de hidrolisado,

melhora seu desempenho tanto para crescimento de biomassa quanto para a eficiência de fermentação.

Após anos utilizando esta mesma linhagem nos processos fermentativos do presente grupo de pesquisa, observou-se um desempenho superior quando comparado com outros trabalhos na literatura, levantando assim a hipótese de que esta levedura poderia ter se adaptado a este meio hostil. Sendo assim, o presente trabalho se propôs, em termos gerais, avaliar o comportamento da levedura *P.stipitis* já existente no presente laboratório quanto ao seu desempenho em crescimento celular e fermentações de hidrolisados hemicelulósicos quando submetida a cultivos sucessivos em meios contendo concentrações crescentes de hidrolisado estéreis e compará-la a levedura *P.stipitis* recém importada do banco de Cepas holandês "Central Bureau voor Schimmelcultures-CBS" tanto para eficiência de fermentação de hidrolisado hemicelulósico quanto para o crescimento celular e capacidade fermentativa na presença de diferentes concentrações de inibidores celulares oriundas do pré-tratamento ácido.

A estrutura da dissertação envolve, inicialmente, uma curta descrição sobre o etanol, suas aplicações e o panorama mundial ao redor deste promissor combustível, com destaque nas características do setor no Brasil. Posteriormente, é apresentado um sumário do que diz respeito ao estado da arte da bioconversão de xilose em etanol (capítulo 2).

Os Objetivos da dissertação, assim como os Materiais e Métodos empregados para a sua realização, encontram-se, respectivamente, nos capítulos 3 e 4. No Capítulo 5 estão exibidos e analisados os Resultados obtidos e Discussão, sendo as Conclusões e Sugestões apresentadas no Capítulo 6. Finalizando, no capítulo 7 encontram-se as Referências Bibliográficas utilizadas para fundamentar o trabalho.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são brevemente apresentados alguns aspectos teóricos referentes à temática abordada: o etanol, a demanda energética, e o futuro dos combustíveis fósseis. Adicionalmente, são destacados aspectos referentes ao bagaço de cana como matéria-prima para a produção de etanol e sua utilização para a obtenção de hidrolisados com alto conteúdo de xilose, assim como algumas características relevantes ao processo de aproveitamento do material lignocelulósico.

2.1. O Etanol

O etanol é um líquido incolor e volátil, de odor ardente característico, facilmente inflamável, de chama azulada que não gera fuligem, e muito higroscópico; sua pureza habitualmente é medida por grau Gay Lussac. No estado desidratado é perfeitamente miscível com substâncias orgânicas ou minerais como ésteres, carburantes e acetonas entre outros. Outras características desta substância encontram-se sumarizadas na Tabela 2.1 (SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005).

Tabela 2.1. Características físico-químicas do etanol.

Fórmula molecular	CH ₃ CH ₂ OH
Massa molecular	46 u.m.a.
Massa específica (20°C)	0,7894 g/mL
(15°C)	0,7942 g/mL
Densidade API	47,1
Índice de refração (20°C)	1,3619
Temperatura de ebulição (1atm)	78,32°C
Temperatura de fusão (1 atm)	-117,22°C
Temperatura de inflamação	12°C
Limite de estabilidade	300°C
Tensão de vapores (0°C)	12,00 mmHg
(20°C)	44,00 mmHg
Calor latente	921096,00 J/kg
Octanagem (ASTM)	99
Índice de Cetano	10
Razão ar:combustível	9,0:1

Adaptado de SOMAVILLA & GOMES NETO (2005).

2.1.1. Aplicações do Etanol

O etanol foi inicialmente utilizado para a produção de bebidas alcoólicas, vinagres e conservas. Atualmente, é aplicado na indústria de fármacos, perfumes e cosméticos; na fabricação de corantes e vernizes, materiais explosivos, seda artificial e materiais plásticos além da sua aplicação como matéria-prima de produtos da química fina. O etanol é utilizado também em iluminação e aquecimento; na produção de éter para misturas com carburantes e na fabricação de borracha sintética (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

No entanto, sendo o etanol uma fonte líquida de energia facilmente estocável, com alto conteúdo de oxigênio (35%) e combustão limpa, tem seu maior potencial de aplicação na área dos combustíveis, sendo utilizado como alternativa à gasolina, como aditivo da mesma e/ou como

insumo na produção de biodiesel (CRUEGER & CRUEGER, 1993; SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005).

Mundialmente, 13% do etanol produzido é utilizado na fabricação de bebidas, 21% para o setor industrial e o 65% restante é aproveitado no setor dos combustíveis (ANP, 2009).

Na atualidade, como outra possível aplicação, pesquisas estão sendo desenvolvidas visando à utilização do etanol como fonte de hidrogênio para sua aplicação nas denominadas células a combustível, aproveitando sua relação carbono/hidrogênio, com alto teor de hidrogênio (uma relação de 6 átomos de hidrogênio por cada 2 átomos de carbono, ou seja 3:1) e vantagens quanto a questões ambientais e de transporte que o etanol apresenta sobre o metano, a substância com a melhor relação carbono/hidrogênio (1:4).

Cabe destacar que a utilização de etanol apresenta as seguintes vantagens:

- É um *commodity* de alta pureza;
- Fácil transporte e estocagem;
- Facilmente miscível com água;
- Baixo perigo de explosão;
- Agente desinfectante;
- Facilmente oxidável;
- Pode ser utilizado como substrato em processos biotecnológicos.

Na Figura 2.1 são apresentadas as aplicações mais comuns para o etanol e alguns dos produtos derivados deste álcool, assim como algumas das substâncias obtidas por meio de biotransformação microbiana.

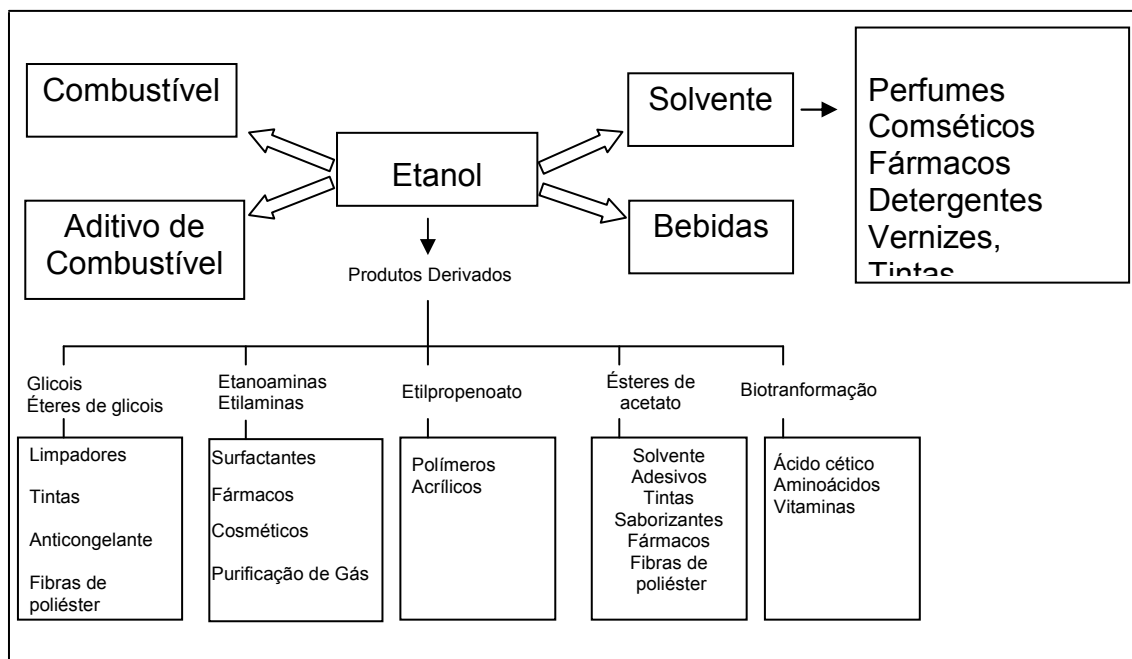


Figura 2.1. Aplicações do etanol.

2.2. Panorama e Perspectivas da Produção de Etanol no Brasil

Recentemente, a demanda mundial por etanol combustível tem se expandido de forma muito rápida, e esta deverá aumentar ainda mais no futuro próximo, principalmente nos países mais desenvolvidos e nos de maior consumo de combustíveis automotivos. Isto se deve a combinação dos seguintes fatores: substituição do MTBE (Éter Metil Térc-Butílico) como aditivo da gasolina (para aumento da octanagem do combustível e como aditivo oxigenado) devido ao impacto ambiental associado ao uso deste éter; adoção de estratégias para a redução/limitação das emissões dos gases precursores do efeito estufa, conforme demandado para alguns países pelo Protocolo de Kyoto; redução da dependência de derivados de petróleo na matriz energética; incentivos à agricultura e às indústrias locais (PIACENTE, 2006).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol e o maior exportador mundial. O país é considerado o líder internacional em matéria de biocombustíveis e a primeira economia em ter atingido um uso sustentável dos biocombustíveis. Em 2008 a produção brasileira foi de

22,5 bilhões de litros. Os Estados Unidos lideram a produção com 34 bilhões de litros (USDA, 2009). A figura 2.2 apresenta o ranking dos principais países produtores de etanol.

O Brasil tem trabalhado não só no sentido de aumentar sua produção de álcool etílico para fins carburantes, a partir da cana-de-açúcar, como também de transferir sua experiência e tecnologia para que outros países tropicais, que dispõem de terras, mão-de-obra e radiação solar intensa, possam ser produtores e exportadores de álcool, ampliando e diversificando sua oferta no mercado mundial. A intenção é tornar o álcool uma commodity internacional.

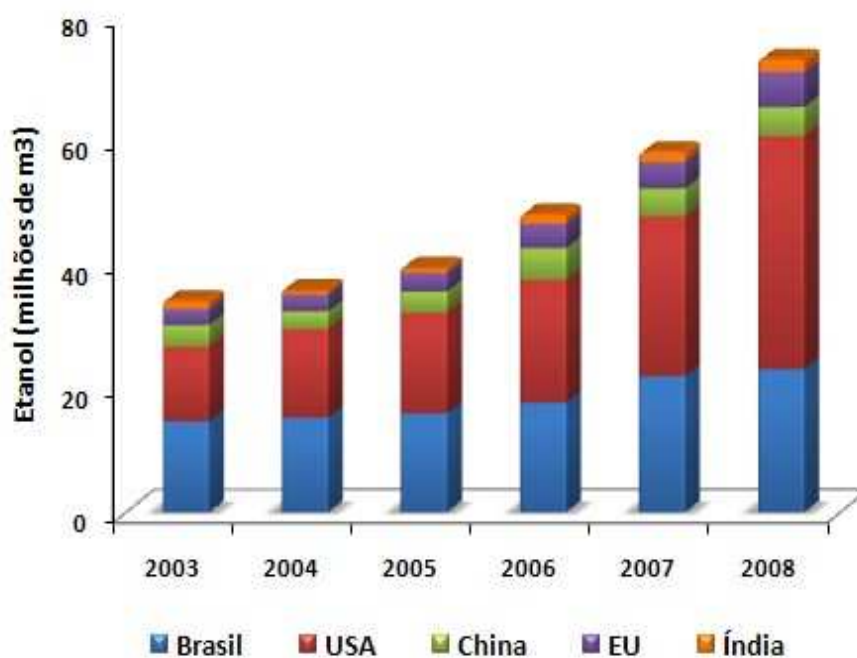


Figura 2.2. Ranking dos países produtores de etanol.
Fonte: LMC International, (2008).

Na safra 2008/2009, segundo a CONAB, foram produzidos no Brasil 26,6 bilhões de litros de álcool (10 bilhões de litros de anidro e 16,6 de hidratado), maior 15,6% do que a safra 2007/2008 na qual foram produzidos 23 bilhões de litros. Na safra 2008/2009 foram produzidas 572

milhões de toneladas de cana-de-açúcar. As figuras 2.3 e 2.4 mostram a evolução da produção de etanol e cana-de-açúcar, respectivamente.

Há vários projetos de investimento em curso no Brasil para elevar a capacidade instalada de produção de álcool via cana-de-açúcar. Estimativas (pré-crise financeira internacional) do setor produtivo indicam investimentos da ordem de US\$ 33 bilhões até 2012 (US\$ 23 bilhões na área industrial e US\$ 10 bilhões na área agrícola) (MAPA, 2009).

O setor sucroalcooleiro tem 418 unidades produtoras, sendo 155 produtoras de álcool, 15 de açúcar e 248 de açúcar e álcool.

Evolução da produção brasileira de álcool.

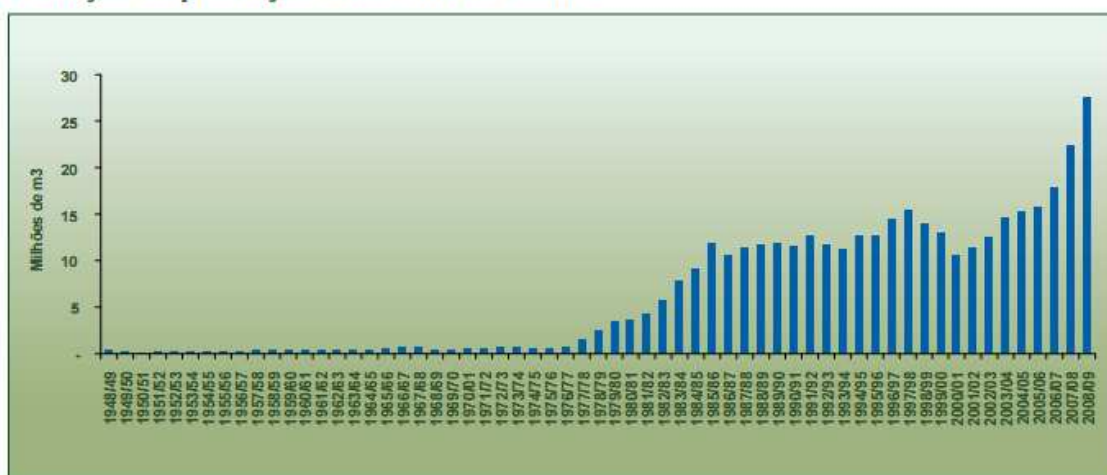


Figura 2.3. Evolução da produção brasileira de álcool.
Fonte: MAPA, 2009.

Em 2008, de acordo com a ANP, o Brasil exportou 5,1 bilhões de litros de álcool, volume 45% superior ao do ano 2007. Em 2009 (janeiro a outubro) o Brasil exportou 3 bilhões de litros de álcool, volume 30% inferior a igual período do ano passado. As receitas obtidas com as exportações de álcool em 2008 foram de US\$ 2,4 bilhões (aumento de 62% em relação a 2007). O Brasil exporta para países como EUA, Japão, Jamaica, Nigéria, Coréia do Sul, Suécia, Países Baixos (Porto de Rotterdam, Holanda), Costa Rica, El Salvador e México.

Evolução da produção brasileira de cana-de-açúcar.

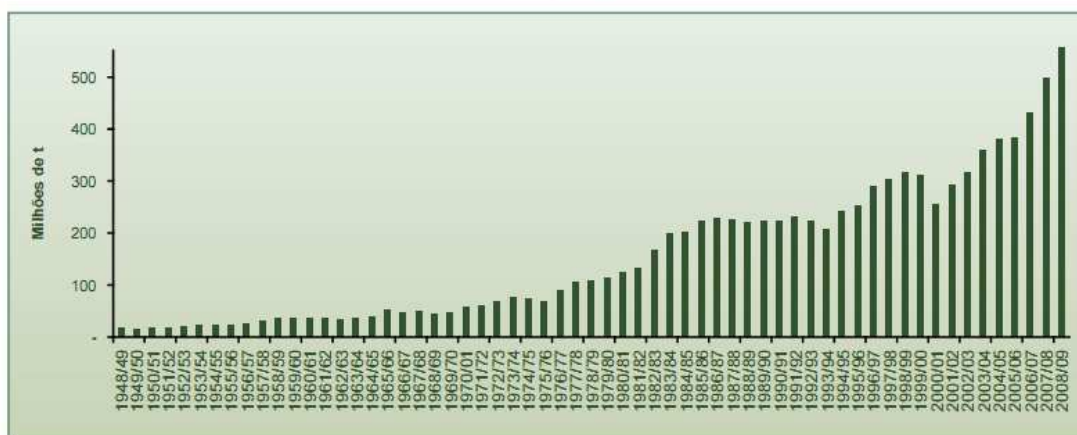


Figura 2.4. Evolução da produção brasileira de cana-de-açúcar.
Fonte: MAPA, 2009.

Os EUA são grandes importadores de álcool brasileiro (1,5 bilhão de litros importados diretamente em 2008), apesar do seu nível elevado de imposto de importação (o álcool importado pelos EUA é tributado com a alíquota específica de US\$ 0,14 por litro e a alíquota *ad valorem* de 2,5%) (MAPA, 2009; ANP, 2009). Empresas brasileiras também exportam para países da América Central e do Caribe etanol hidratado que é reindustrializado (desidratado e transformado em anidro) e reexportado para os EUA. Os países da União Européia também importam volumes significativos do Brasil. Em 2008 importaram cerca de 1,5 bilhão de litros de álcool do Brasil. Na União Européia, o imposto que incide sobre o álcool brasileiro tem dois valores: US\$ 0,24 por litro para o álcool etílico não desnaturado e US\$ 0,13 por litro para o álcool etílico e aguardentes, desnaturados (MAPA, 2009). A Tabela 2.2 mostra a evolução da exportação e importação do álcool etílico no Brasil.

Tabela 2.2. Exportação e importação de álcool etílico no Brasil.

EXPORTAÇÃO E IMPORTAÇÃO DE ÁLCOOL ETÍLICO						
Anos	Exportação		Preço Médio	Importação		Preço Médio
	US\$ mil	(Mil) Litros	US\$/Litro	US\$ mil	(Mil) Litros	US\$/Litro
1995	106.919	320.081	0,33	471.690	1.417.409	0,33
1996	95.420	261.308	0,37	327.387	926.681	0,35
1997	54.129	146.594	0,37	179.613	529.865	0,34
1998	35.520	117.926	0,30	4284	12474	0,34
1999	65.849	407.220	0,16	4.191	17.918	0,23
2000	34.786	227.258	0,15	11.932	63.958	0,19
2001	92.146	345.675	0,27	42.692	117.860	0,36
2002	169.153	759.016	0,22	868	1.729	0,50
2003	157.962	757.375	0,21	1.465	6.171	0,24
2004	497.740	2.321.410	0,21	317	376	0,84
2005	765.529	2.592.293	0,30	295	227	1,30
2006	1.604.730	3.428.862	0,47	249	96	2,59
2007	1.477.646	3.532.667	0,42	2.037	4.108	0,50
2008	2.390.110	5.123.993	0,47	773	467	1,66
Jan-Jul/2009	741.290	1.933.585	0,38	552	2.370	0,23
Jan-Jul/2008	1.171.208	2.570.583	0,46	551	348	1,58
Var.(%) 2009/2008	-36,71	-24,78	-15,86	0,18	581,03	-85,29

Fonte: Secex/SDP (2009).

2.3. Aspectos Sócio-Econômicos do PROALCOOL

Com a crise do petróleo, em 1975, foi criado o PróÁlcool (através do decreto nº 76.593), com a implantação de diversas destilarias de

etanol em todo o Brasil, visando o uso alternativo deste combustível em substituição ao petróleo e seus derivados. O governo brasileiro passou a investir grandes quantias no cultivo da cana de açúcar a fim de se obter o etanol a partir da fermentação da sacarose (LORA & ANDRADE, 2009).

O desenvolvimento promovido pelo PROALCOOL, criado para diminuir a dependência ao petróleo com a utilização de etanol, permitiu ao Brasil economizar 1,8 bilhões de dólares por ano (equivalentes à utilização de 200 mil barris de gasolina por dia); movimentar uma frota de veículos movidos a álcool de 2,5 milhões de unidades; contribuir com 16% da matriz energética renovável do país; e converter o Brasil no maior produtor e exportador de álcool no mundo (SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005; FAIRBANKS, 2003).

Tecnologicamente, o PROALCOOL possibilitou a modernização técnica das usinas produtoras de etanol, do sistema de distribuição do biocombustível e do setor agrícola a ele ligado, assim como impulsionou o desenvolvimento dos motores para a utilização do etanol como combustível e dos motores *Flex Fuel*, utilizados para qualquer mistura etanol-gasolina, tornando o Brasil referência mundial (SCHMIDELL *et al.*, 2001^A; SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005).

De 1975 a 2000, foram produzidos cerca de 5,6 milhões de veículos a álcool hidratado. Acrescido a isso, o Programa substituiu por uma fração de álcool anidro (entre 1,1% a 25%) um volume de gasolina pura consumida por uma frota superior a 10 milhões de veículos a gasolina, evitando, assim, nesse período, emissões de gás carbônico da ordem de 110 milhões de toneladas de carbono (contido no CO₂), a importação de aproximadamente 550 milhões de barris de petróleo e, ainda, proporcionando uma economia de divisas da ordem de 11,5 bilhões de dólares (SCANDIFFIO, 2005).

A partir de 1986, o cenário internacional do mercado petrolífero é alterado. Os preços do barril de óleo bruto caíram de um patamar de US\$ 30 a 40 para um nível de US\$ 12 a 20.

Esse novo período, denominado “contra choque do petróleo”, colocou em xeque os programas de substituição de hidrocarbonetos fósseis e de uso eficiente da energia em todo o mundo. Na política energética brasileira, seus efeitos foram sentidos a partir de 1988, coincidindo com um período de escassez de recursos públicos para subsidiar os programas de estímulo aos energéticos alternativos, resultando num sensível decréscimo no volume de investimentos nos projetos de produção interna de energia. A oferta de álcool não pôde acompanhar o crescimento descompassado da demanda, com as vendas de carro a álcool atingindo níveis superiores a 95,8% das vendas totais de veículos de ciclo Otto para o mercado interno em 1985 (ZANCANER, 2008).

Apesar de seu caráter efêmero, a crise de abastecimento de álcool do fim dos anos 1980 afetou a credibilidade do Pró Álcool, que, juntamente com a redução de estímulos ao seu uso, provocou, nos anos seguintes, um significativo decréscimo da demanda e, conseqüentemente, das vendas de automóveis movidos por esse combustível. Deve-se acrescentar ainda outros motivos determinantes que, associados, também contribuíram para a redução da produção dos veículos a álcool. No final da década de 1980 e início da década de 1990, o cenário internacional dos preços do petróleo sofreu fortes alterações, tendo o preço do barril diminuído sensivelmente. Somando-se a isto, a cotação do açúcar sobe no mercado internacional: é a crise de abastecimento do álcool. Os consumidores voltam a preferir os carros a gasolina, pois estes começam a apresentar preços relativos melhores. Como conseqüência, os usineiros direcionam seus investimentos para a produção do açúcar (VEIGA FILHO, 1998).

A crise de abastecimento de álcool somente foi superada com a introdução no mercado do que se convencionou chamar de mistura MEG, que substituía, com igual desempenho, o álcool hidratado.

Essa mistura (60% de etanol hidratado, 34% de metanol e 6% de gasolina) obrigaria o país a realizar importações de etanol e metanol (que no período entre 1989-95 superou a 1 bilhão de litros) para garantir o abastecimento do mercado ao longo da década de 1990. A mistura atendeu as necessidades do mercado e não foram constatados problemas sérios de contaminação e de saúde pública (ZANCANER, 2008).

Após ascensão e declínio, quando o Proálcool parecia fadado ao fracasso, o programa ganha novo fôlego, derivado em parte de novo aumento do preço do petróleo no mercado internacional, da conscientização do Protocolo de Kyoto e do surgimento dos veículos bicom bustíveis (*flex fuel*).

Segundo Michellon *et al.* (2008), a nova alta do petróleo trouxe a tona novamente a discussão da dependência do combustível fóssil, estimulando o debate e a busca de fontes alternativas renováveis de energia. Houve também, a maior conscientização do Protocolo de Kyoto (1997), tratado internacional, cujo objetivo principal é conseguir que os países desenvolvidos reduzam em 5% a emissão de gases causadores do efeito estufa em relação ao nível de emissão de 1990, entre 2008 e 2012. Contudo, reativou os projetos de substituição de combustíveis fósseis pelos renováveis, que são menos poluentes. Em março de 2003, foi lançado no mercado brasileiro o veículo bicom bustível, movido tanto a álcool como a gasolina, tecnologia conhecida como "*flex fuel*", a demanda interna por álcool aumentou e continua aumentando. Assim, o Brasil tem um dos seus maiores desafios que é atender as crescentes demandas externa e interna. A Figura 2.5 e 2.6 exibem o consumo de etanol no Brasil desde 1990 e a Produção Brasileira de Álcool (m³) por Região, respectivamente.

Consumo de álcool combustível no Brasil.

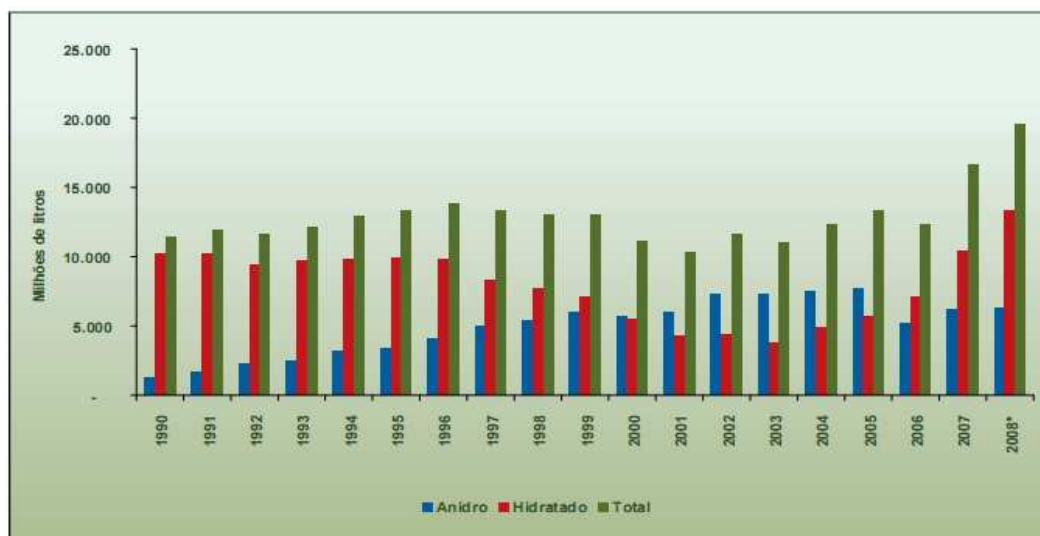


Figura 2.5. Consumo de etanol no Brasil.
Fonte: MAPA, (2009).

Produção Brasileira de Álcool (m³).

Regiões	Safras					
	04/05	05/06	06/07	07/08	08/09	09/10(*)
Norte/Nordeste	1.825.786	1.508.085	1.770.726	2.193.358	2.410.999	1.449.361
Centro/Sul	13.382.123	14.298.845	16.160.925	20.252.621	25.270.240	23.083.871
Total Brasil	15.207.909	15.806.930	17.931.651	22.445.979	27.681.239	24.533.232

Fonte: DCAA/SPA/EMATER

(*) Posição em 01/01/2010

Figura 2.6. Produção brasileira de álcool (m³) por região.
Fonte: MAPA, (2009).

2.4. Processos para Produção de Etanol

Desde os tempos antigos, o álcool foi produzido por meio de diversos processos artesanais de fermentação, principalmente, na

produção de bebidas para o consumo humano. Posteriormente, com o desenvolvimento da microbiologia industrial, o álcool foi produzido em quantidades que permitiram seu uso como matéria-prima para diversos produtos químicos e como combustível (CRUEGER & CRUEGER, 1993). Assim, atualmente o etanol é obtido utilizando-se três vias: degradativa, fermentativa e sintética, sendo o processo de fermentação o mais utilizado por ser mais econômico (SCHMIDELL *et al.*, 2001^A).

Em termos gerais o processo de bioprodução de etanol pode ser sintetizado da seguinte forma: a matéria-prima, seja qual for sua origem, é submetida a um pré-tratamento que permite a liberação de glicídios que são, subseqüentemente, metabolizados por um agente biológico adequado. Esses pré-tratamentos, físicos, químicos ou enzimáticos, dependem do tipo de matéria-prima e do agente biológico a ser utilizado. Após a degradação do substrato, por meio de uma seqüência de reações, o agente biológico é separado do meio fermentado e reaproveitado ou direcionado a processos de adequação para sua disposição final. O líquido é destilado no intuito de concentrar o etanol até um nível determinado ou até o limite possível, o azeótropo etanol-água (95.5% etanol). Esse azeótropo é comumente comercializado como etanol hidratado, mas é possível a obtenção de etanol anidro por meio de processos de desidratação como o arraste com benzeno ou o uso de absorventes regeneráveis (LEAL, 1998; SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005; MAIORELLA *et al.*, 1983).

2.5. Matérias-Primas Utilizadas na Bioprodução de Etanol

Atualmente, o etanol é produzido industrialmente a partir de matérias-primas açucaradas e amiláceas, como o caso do caldo extraído da cana-de-açúcar (no Brasil) ou do amido produzido a partir

de milho (nos Estados Unidos) (FAIRBANKS, 2003). Na Figura 2.7 é apresentado um diagrama de blocos para a obtenção de etanol a partir de diferentes matérias-primas, no qual podem-se observar etapas comuns entre os processos.

As tendências atuais sinalizam ao desenvolvimento de tecnologias que permitam o aproveitamento de resíduos agroindustriais como os materiais lignocelulósicos, atualmente denominados biomassas, como o objetivo de diminuir os custos associados às matérias-primas, que podem atingir 2/3 do custo total da produção, e incrementar os níveis de produtividade sem a necessidade de aumentar as áreas de cultivo. Deste modo, investiga-se o aproveitamento de biomassas como palhas, bagaço, folhas e resíduos de exploração madeireira entre outros, que estão constituídos por açúcares que podem ser liberados utilizando diferentes processos físicos ou químicos, sendo esta uma etapa crucial no processo (PEREIRA JR, 2008).

2.5.1. Materiais Lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas basicamente de hemicelulose e celulose (Figura 2.8), infiltradas por outra estrutura formada por álcoois aromáticos, a lignina, à qual encontram-se unidas por ligações de hidrogênio e covalentes (LEE, 1997). Em menores proporções podem ser encontrados também resinas, taninos, ácidos graxos, fenóis, compostos nitrogenados e sais minerais, principalmente, de cálcio, potássio e magnésio (SHLESER, 1994; SOMERVILLE *et al*, 2007). A Tabela 2.3. Exibe a composição lignocelulósica de alguns resíduos Agro-Industriais.

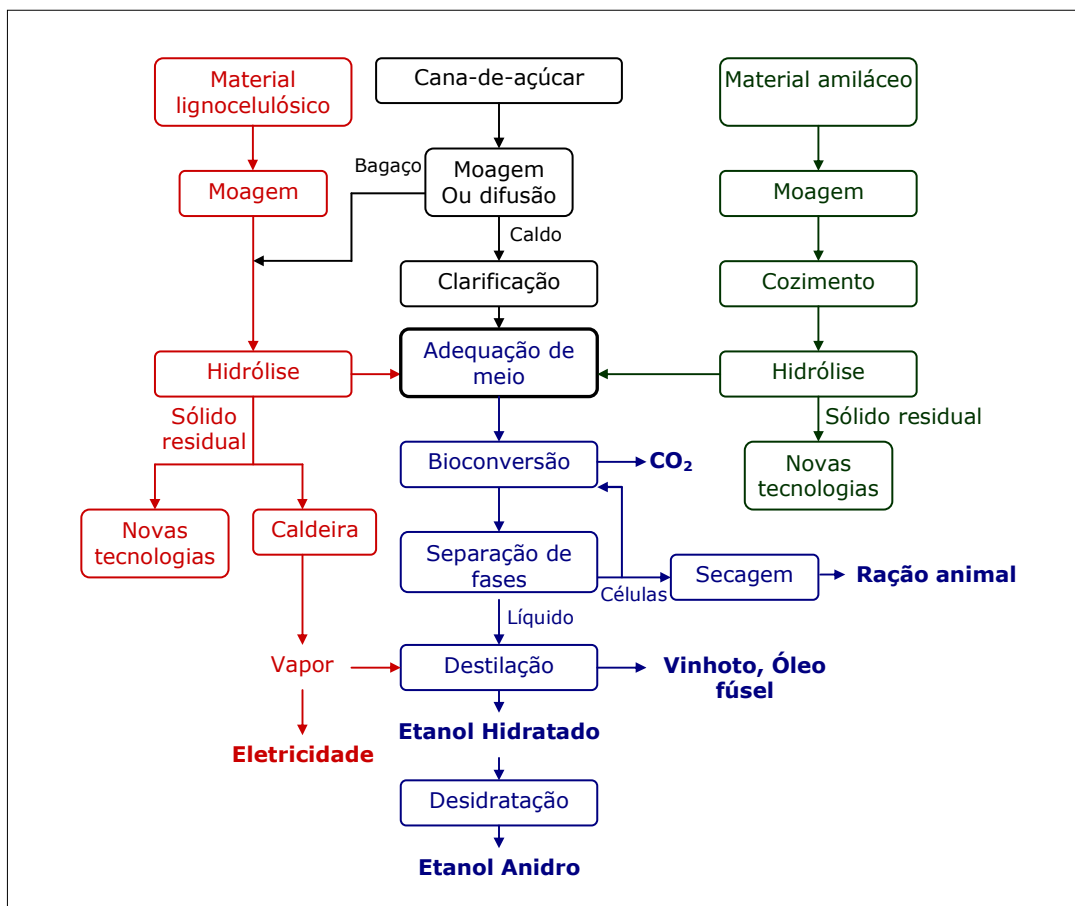


Figura 2.7. Alternativas para a bioprodução de etanol. Adaptado de PEREIRA Jr. (1991)

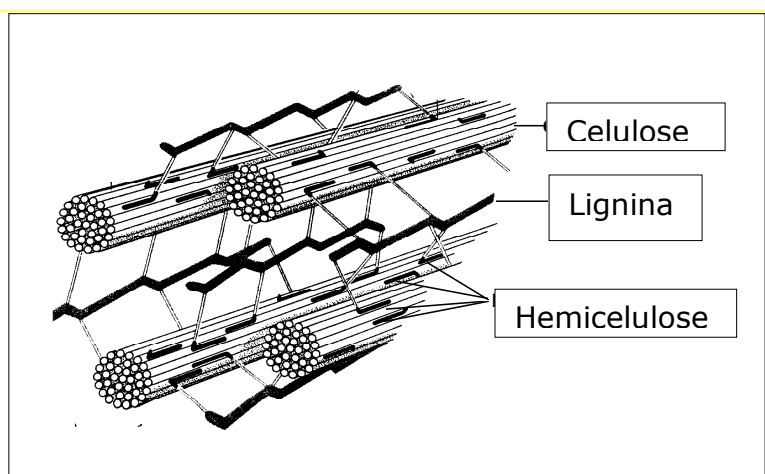


Figura 2.8. Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico. Adaptado de SHLESER (1994)

Tabela 2.3. Composição lignocelulósica de alguns resíduos agro-industriais.

BIOMASSA RESIDUAL	COMPOSIÇÃO (%)				
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Extrativos	Cinzas
Bagaçõ de Cana	33-36	28-30	18-20	4-6	2-4,8
Palha de arroz	32-37	19-24	9 13	4-5	12-18
Sabugo de Milho	34-36	16-24	15-19	2-6	2-4
Palha de trigo	30-33	22-28	14-18	3-7	3-7
Palha de sorgo	34-36	25-26	25-26	-	-
Jornal Impresso	40-55	25-40	18-30	-	-
Madeiras	~50	~20	15-20	Até 10	Até 5

Fonte: SUN & CHENG (2002); PANDEY et al. (2000); OLSSON & HAHN-HAGERDAL,(1996).

2.5.2. A Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta que pertence ao gênero *Saccharum*. Há pelo menos seis espécies do gênero, sendo a cana-de-açúcar cultivada um híbrido multiespecífico, recebendo a designação *Saccharum* spp., pertencente família Poaceae, representada pelo milho, sorgo, arroz e muitas outras gramas. As espécies de cana-de-açúcar são provenientes do Sudeste Asiático.

O cultivo de cana de açúcar começou no Brasil no século XVII com o intuito de produzir açúcar e romper com o monopólio promovido pela França. No início da década de 70 a produção atingia os 50 milhões de toneladas e, com a implantação do PROALCOOL, este valor quadruplicou-se no ano de 1985 (MOREIRA & GOLDEMBERG, 1999). A partir desse ano a produção de cana-de-açúcar tem apresentado um comportamento variável em cada safra, com uma tendência global de crescimento, como pode ser observado na Figura 2.4., principalmente após 2001 com o aumento nos preços do petróleo e o interesse mundial pelos biocombustíveis.

Cabe lembrar que o setor sucro-alcooleiro é um dos mais importantes do país, tendo como etapa inicial o cultivo de cana-de-açúcar. De acordo com dados da safra 2008/2009, este setor anualmente movimenta mais de R\$ 51 bilhões, gera 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos, participa com 1,8% do PIB (Produto Interno Bruto) brasileiro e envolve mais de 72000 agricultores (PROCANA,2010).

2.5.3. Bagaço de Cana-de-Açúcar: Matéria-prima Lignocelulósica por Excelência

Com a moagem da cana-de-açúcar para a extração do suco de cana, geram-se grandes quantidades de bagaço de cana. Segundo LAMONICA (2005), assim como a palha, o bagaço compõe-se, em média, de 28% do peso da cana de açúcar, ou seja, a cada 1 tonelada de cana processada, 280 kg de bagaço de cana com 50% de umidade são gerados. Este material é atualmente utilizado para a produção de vapor e eletricidade em processos de pouca eficiência, devido à inexistência de aplicações mais atraentes. Apesar dessa aplicação, entre 10% e 15% do bagaço é gerado com excedente no processo, não tendo uma destinação apropriada, tornando-se poluente (FAIRBANKS, 2003; MUSTAFA *et al*, 2008).

Atualmente, pretende-se desenvolver processos para aproveitar mais racionalmente o bagaço de cana, como a produção biotecnológica de etanol, xilitol e ácido succínico, entre outras. Para este tipo de aproveitamento é necessária a liberação dos glicídeos constituintes das diferentes frações polisacarídicas, utilizando-se pré-tratamentos com alta eficiência na extração de glicídios, economicamente viáveis, pouca degradação dos açúcares e baixas concentrações de inibidores (SUN & CHENG, 2002, MUSTAFA *et al*, 2008).

A existência de processos de monomerização eficientes, unida à integração energética das usinas, que inclui o uso de caldeiras mais

eficientes (já existentes), e à substituição de parte do bagaço queimado por outros materiais como palha, permitiria uma disponibilidade de bagaço próxima a 78% do obtido no processo de moagem. Esse maior excedente poderia ser destinado a etapas de pré-tratamento e posterior transformação em substâncias de maior interesse, aumentando a produtividade das indústrias sem acréscimos nas áreas de plantio. No caso brasileiro estima-se que o bagaço excedente, se fosse utilizado para a produção de etanol, permitiria duplicar a produção no país (PEREIRA, 2006).

A seguir, são descritos alguns dos pré-tratamentos utilizados no aproveitamento de materiais lignocelulósicos e, conseqüentemente, passíveis de serem aplicados ao bagaço de cana.

2.5.4. A Fração Celulósica

A celulose, o maior constituinte da parede celular das plantas e uma das estruturas constantemente regenerada, é um homopolissacarídeo linear composto por unidades de β -D-glicose, unidas por ligações $\beta(1-4)$ carbono-carbono (Figura 2.9 (A)) (PANDLEY, 2000; LEE, 1997). Este homopolissacarídeo possui entre 8000 e 14000 unidades de glicose, dependendo do tipo de planta, apresentando uma massa aproximada de 2,3 milhões de umas (unidades de massa atômica) (SHLESER, 1994).

As cadeias de celulose formam entre si ligações de hidrogênio intramoleculares (O6-H-O2' e O6-H-O3') e intermoleculares (O3-H-O5') (Figura 2.9 (B)). Estas ligações conferem alta rigidez e ordenção à estrutura, criando as denominadas regiões cristalinas, responsáveis pela insolubilidade e pouca reatividade da celulose, sendo esta uma das maiores barreiras para o aproveitamento biotecnológico da fração (LEMOS, 2001).

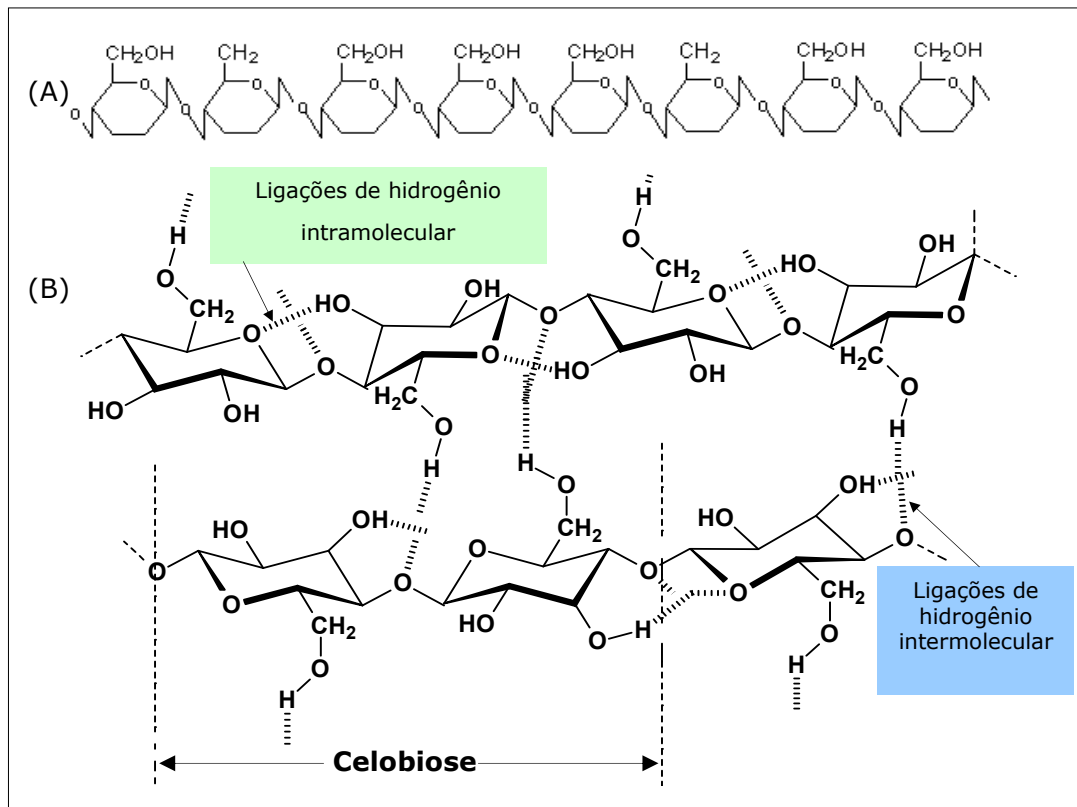


Figura 2.9. Disposição das moléculas de glicose, unidas por ligações glicosídicas(A) (COUGHLAN, 1985 *apud* LEMOS, 2001); Estrutura simplificada da celulose (B) (PEREIRA Jr., 1991).

Uma das maiores dificuldades para a conversão biotecnológica da celulose é hidrolisar a molécula até obter os sacarídeos constituintes da fibra. A resistência a hidrólises dessa estrutura é conferida pelas regiões cristalinas e pela barreira física gerada pela lignina presente nos materiais lignocelulósicos. No entanto, existem algumas regiões amorfas, ou não cristalinas, mais susceptíveis à hidrólise. Quando a celulose é hidrolisada em condições brandas é obtida, como unidade de repetição, a celobiose (BETANCUR, 2005).

2.5.5. Lignina

A lignina, presente em todas as plantas superiores, é a responsável pela rigidez da parede celular em vegetais, da sua resistência ao impacto, compressão e dobra, sendo também um agente permanente de ligação

entre as células (LEMOS, 2001). Cabe destacar que os compostos derivados da lignina, quando liberados, dificultam os processos fermentativos. Estruturalmente, é uma complexa macromolécula aromática, hidrofóbica e opticamente inativa, com numerosas ligações cruzadas (aproximadamente 10 tipos diferentes). Deriva-se da polimerização desidrogenativa de três álcoois: álcool trans-coniferílico, trans-p-cumárico e álcool trans-sinapílico (Figura 2.10) (CARAMEZ, 1999).

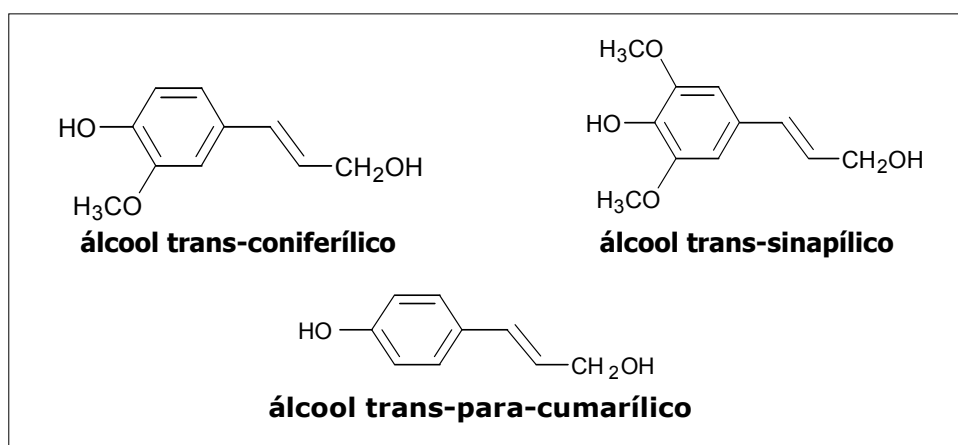


Figura 2.10. Álcoois precursores da lignina.
Fonte: Adaptado de PEREIRA JR. *et al* (2008).

Durante o processo de formação da lignina, reações secundárias levam a ligações entre a macromolécula e a hemicelulose formando uma matriz que envolve a celulose, criando um dos impedimentos para a hidrólise das estruturas polissacarídicas. Essas ligações são formadas entre as unidades de fenil-propano da lignina e os resíduos de ácido glucurônico e arabinose das xilanas (LEMOS, 2001; FAIRBANKS, 2003).

2.5.6. A Fração Hemicelulósica

Na estrutura da hemicelulose participam pelo menos dois tipo de unidades de açúcar, formando cadeias entre 100 e 200 unidades de pentoses e hexoses. Dos monômeros encontrados destacam-se a β -D-manose, β -D-glicose, α -L-arabinose, α -D-galactose e,

principalmente, β -D-xilose. Adicionalmente, encontram-se ácidos como β -D-glucurônico, β -D-galactourônico e α -D-4-O-metilglucurônico, assim como alguns grupos acetil (CARAMEZ, 1999). A macromolécula de hemicelulose (Figura 2.11), sem regiões cristalinas devido ao seu grau de ramificação, está constituída, majoritariamente, por uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular como xilanas, arabinanas e mananas, mas podem ser encontrados polissacarídeos mais complexos como arabinoxilanas, glucoarabinoxilanas, arabinogalactanas, arabinoglucouranoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas, galactoglucomananas e galactomananas (FOGEL, 2004).

A xilana é o componente majoritário do complexo hemicelulósico, constituindo entre 15% e 30% da massa seca de madeira e resíduos agro-industriais (CARAMEZ, 1999). Em termos gerais, é um polissacarídeo de cadeia linear formada por unidades de xilose, as quais se encontram unidas por ligações β -(1,4) xilanopiranosil, e freqüentemente, carregam substituintes como acetil, arabinosil e glucouranosil. Devido ao menor grau de cristalinidade e à menor estabilidade das ligações glicosídicas, comparando-se à celulose, os monômeros constituintes das xilanas podem ser recuperados com altos rendimentos utilizando ácidos diluídos (PEREIRA Jr., 1991; DU PREEZ *et al.*, 1994).

A composição básica dos materiais lignocelulósicos, no que diz respeito à proporção das suas frações principais, depende do vegetal de origem, o tipo de material (palha, bagaço, cascas, etc.), da variedade, região de cultivo, idade e período do ano ao momento da coleta. Conforme previamente exibido, na Tabela 2.3 apresentam-se alguns materiais lignocelulósico e sua composição básica. Igualmente, a composição em glicídeos é a sumarizada na Tabela 2.4, sendo esses açúcares o verdadeiro objeto de interesse para a produção de diferentes substâncias por via biotecnológica.

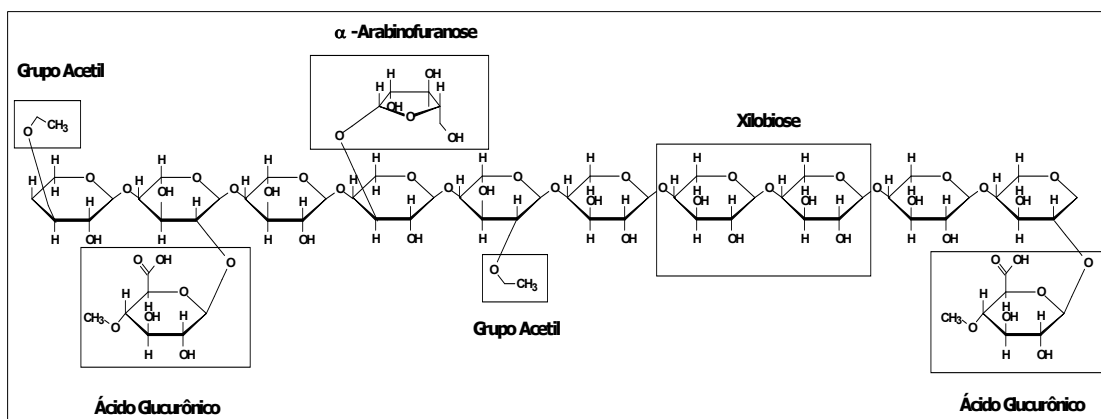


Figura 2.11. Estrutura típica da hemicelulose.

Fonte: MUSSATTO (2002)

Cabe destacar que entre os resíduos agro-industriais com maior conteúdo de hemicelulose, e conseqüentemente xilose, encontra-se o bagaço de cana, como observado nas tabelas citadas, sendo este o objeto de estudo do presente trabalho.

Tabela 2.4. Constituintes básicos de alguns materiais lignocelulósicos.

	Sabugo de milho	Palha de trigo	Palha de arroz	Bagaço de cana	Semente de algodão	Jornal impresso	Resíduos urbanos
Glicídeos (%)							
Glicose	39,0	36,6	41,0	38,1	20,0	64,4	40,0
Manose	0,3	0,8	1,8	n.d.	4,1	16,6	8,0
Galactose	0,8	4,4	0,4	1,1	0,1	n.d.	n.d.
Xilose	14,8	19,2	14,8	23,3	4,6	4,6	14,0
Arabinose	4,2	4,4	4,5	4,5	4,3	0,5	4,0
Outros (%)							
Lignina	15,1	14,5	9,9	18,4	17,6	21,0	20,0
Cinzas	4,3	9,6	4,4	4,8	14,8	0,4	1,0
Proteínas	4,0	4,0	n.d.	4,0	4,0	n.d.	n.d.

n.d. – medidas não determinadas.

Fonte: LEE (1997)

2.6. Pré-Tratamentos para Materiais Lignocelulósicos

Os diferentes tipos de pré-tratamento, aplicados para clivar as ligações das macroestruturas presentes nos materiais lignocelulósicos, podem ser classificados como físicos, físico-químicos, químicos e biológicos.

Como pré-tratamentos físicos são conhecidos os processos de trituração mecânica e a pirólise. O primeiro é caracterizado pela cominuição do material por fragmentação, moagem ou esfarelamento, enquanto no último processo o material é submetido a altas temperaturas para a formação de gás de síntese (SUN & CHENG, 2002). Adicionalmente, são utilizados tratamentos térmicos ao material imerso em vapor saturado ou em água a temperaturas que variam de 170°C até 230°C e tempos que vão de alguns minutos até várias horas (LASER, 2002).

Os pré-tratamentos físico-químicos são utilizados, principalmente, para aumentar a susceptibilidade do material lignocelulósico ao ataque enzimático. Caracterizam-se pelo emprego de condições de pressões e temperaturas severas, com a posterior despressurização rápida. (SUN & CHENG, 2002; MACKIE *et al.*, 1985; LAVARACK *et al.*, 2000). Entre os pré-tratamentos deste tipo destacam-se:

- Explosão a vapor ou auto-hidrólise: Neste processo o material é tratado em contato com vapor de água saturado, permitindo a solubilização de alguns monômeros e variados polissacarídeos da fração hemicelulósica, a transformação de uma parte da lignina e o aumento da susceptibilidade da celulose a posterior hidrólise.
- Explosão por amônia: Neste caso o material é impregnado ou embebido numa solução de amônia durante o processo, tendo como princípio a alta solubilidade de hemiceluloses em ambientes alcalinos.

No entanto, há que se destacar que igualmente às hemiceluloses a lignina também tem a sua solubilidade aumentada em meio básico.

- Explosão por CO₂: O processo é realizado na presença de CO₂, que se transforma no correspondente ácido e incrementa o processo hidrolítico.

No caso dos pré-tratamentos químicos as características de cada processo são variadas (AGUILAR *et al.*,2002; SUNG & CHENG,2002). Alguns desses processos são descritos a seguir:

- Hidrólise ácida: Neste processo são utilizados ácidos como catalisadores do rompimento das ligações entre as frações e suas próprias ligações internas, em condições que variam desde as mais drásticas, para hidrólise de celulose, até moderadas para a solubilização seletiva da fração hemicelulósica.
- Ozonólise: O ozônio é utilizado neste processo para retirar a lignina do material lignocelulósico deixando-o mais acessível ao ataque enzimático.
- Hidrólise alcalina: A presença de álcalis durante o processo de hidrólise permite a saponificação de ligações éster, ocorrentes entre xilanas e entre xilana e lignina, permitindo a extração de uma parte destas frações, ao mesmo tempo em que é reduzida a cristalinidade das fibras.
- Deslignificação oxidativa: Enzimas peroxidases são utilizadas para biodegradar a lignina em presença de H₂O₂, aumentando a susceptibilidade das fibras a posteriores processos de hidrólises.

- Processo *organosolv*: Uma mistura de ácido e solvente orgânico, geralmente etanol, é utilizada neste processo para o rompimento das ligações internas da lignina e a hemicelulose.

Devido ao baixo rendimento na monomerização de hemicelulose quando utilizada a explosão a vapor, usada industrialmente para aumentar a digestibilidade de materiais lignocelulósicos, a hidrólise ácida da fração hemicelulósica apresenta-se como o processo mais promissor para o aproveitamento biotecnológico desta fração, sendo possíveis eficiências de hidrólise superiores aos 95% (FOGEL, 2005). Por essa razão que a hidrólise ácida, escolhida para o desenvolvimento do presente trabalho, será descrita com maior detalhe na seqüência.

2.6.1. Pré-Tratamento Ácido

Esta técnica é especialmente útil na separação e solubilização da fração hemicelulósica. Quando realizada com ácidos diluídos, permite igualmente, aumentar a susceptibilidade da celulose a futuros processos de hidrólise sem afetar, notavelmente, sua estrutura base. Essa característica do processo permite a obtenção de hidrolisados com alto conteúdo de xilose em relação a outros glicídeos.

Durante a hidrólise ácida, os catalisadores liberam prótons que clivam as ligações heterocíclicas de éter entre os monômeros das cadeias poliméricas da hemicelulose e, no caso de ácidos concentrados, da celulose. Com a clivagem dos polímeros são liberadas diversas substâncias, sendo majoritária a presença de xilose, glicose e arabinose. Entre os ácidos utilizados para este tipo de pré-tratamento, encontram-se: H_2SO_4 , HCl, HF, CH_3COOH e HNO_3 (AGUILAR *et al.*, 2002; SUN & CHENG, 2002; CUZENS & MILLER, 1997; RODRÍGUEZ-CHONG *et al.*, 2004).

Processos de hidrólise ácida têm sido investigados em escala piloto para obter glicídeos fermentáveis a partir de bagaço de cana. No Brasil, tem-se desenvolvido um processo denominado DHR (Dedini Hidrólise Rápida), no qual o bagaço é misturado em contracorrente com uma solução aquecida de água, ácido sulfúrico e etanol. A solução aquosa separada da mistura é posteriormente resfriada e neutralizada com cal, precisando ser misturada com melaço de cana para sua fermentação. A lignina é separada e o etanol recirculado ao processo (FAIRBANKS, 2003).

2.6.2. Inibidores do Processo de Fermentação

Como uma desvantagem do processo de hidrólise ácida, cabe destacar a formação de inibidores do crescimento celular e da fermentação de xilose. Por exemplo, a presença de hexoses como manose, galactose e glicose, e/ou de pentoses, pode promover uma diminuição na utilização da xilose, por preferência metabólica por esses glicídeos, ou a inibição das enzimas responsáveis do metabolismo desta pentose. Contudo, o consumo de xilose é restabelecido quando esgotados esses glicídeos fermentáveis (DU PREEZ, *et al.* 1989).

Outros tipos de inibidores podem limitar, e até impedir, o consumo da fonte de carbono e/ou reduzir a cinética de crescimento, prejudicando o desempenho da fermentação. A inibição pode também ser resultado da sinergia entre as várias substâncias presentes no hidrolisado. Cabe ressaltar que um dos objetivos do presente estudo foi justamente determinar as concentrações toleráveis e quais concentrações destes inibidores (ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural) não influenciariam substancialmente o crescimento de biomassa nem a fermentação do hidrolisado hemicelulósico, sendo assim, segue de forma sumarizada os possíveis efeitos celulares causados pela maioria destas substâncias tóxicas geradas no pré-tratamento ácido:

Ácido acético: este ácido é gerado a partir dos grupos acetil presentes na estrutura hemicelulósica. Tem-se reportado concentrações de até 17 g/L em hidrolisado de bagaço de cana, dependendo das condições nas quais é realizada a hidrólise ácida (PARAJÓ, 1998^b). O ácido, na forma não dissociada, pode-se difundir ao citoplasma da célula e reduzir o pH intracelular, gerando problemas para a produção de energia e o transporte de diversos nutrientes, aumentando o requerimento energético da célula. A assimilação do ácido pelas leveduras depende, principalmente, de sua concentração e do pH, fatores chave na dissociação do ácido, assim como do nível de aeração do meio. Mecanismos semelhantes de inibição têm sido reportados para o acetaldeído. De acordo com TOSETTO (2008), a presença de ácido acético no meio de fermentação provoca uma queda nos parâmetros $Y_{x/s}$, Produtividade e consumo de ART.

Furfural: é um aldeído com natureza aromática formado pela hidrólise de materiais lignocelulósicos que contém pentoses, como o bagaço de cana (GUTIÉRREZ *et al.*, 2002). Este tipo de substância reduz o crescimento celular, a formação de ATP e a produção de etanol (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000). Segundo o tipo de microrganismo, pode causar a morte da célula ao interferir com a respiração e a fosforilação oxidativa. Em sua forma reduzida, álcool furfurílico, também gera efeitos inibitórios de menor intensidade (PARAJÓ, 1998^B).

Hidroxi-metil-furfural (HMF): com um mecanismo de ação similar ao descrito para o furfural, reduzindo a formação de ATP e a produção de etanol. O HMF é assimilado em taxas menores tendo o efeito de aumentar a fase lag de crescimento das células. Esta substância é gerada da degradação de hexoses durante o processo da hidrólise (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000). De acordo com TOSETTO (2008), para *Saccharomyces cerevisiae*, com o aumento da concentração de HMF ocorre uma queda nos parâmetros $Y_{p/s}$, produtividade e consumo de ART.

Para algumas cepas desta espécie a produtividade e o consumo de ART chegam a zero quando as concentrações de HMF superam 500 PPM.

Substâncias Fenólicas: Estas substâncias são geradas nos processos de degradação da lignina, que ocorrem durante a hidrólise ácida. As substâncias fenólicas atuam debilitando as membranas celulares, o que diminui a capacidade de proteção e produção enzimática das células. Adicionalmente, tem sido reportada a inibição do consumo de xilose na presença de alguns compostos fenólicos de baixa massa molecular. Entre as substâncias fenólicas geradas da degradação da lignina encontram-se: ácido p-hidroxibenzóico, ácido m-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina, ácido cinâmico, siringaldeído, cinamaldeído, p-hidroxicinamaldeído, álcool coniferílico e álcool 3,5-dimetoxi-4-hidroxinamílico. Cabe destacar que os ácidos aromáticos são menos tóxicos que seus aldeídos, e que os ácidos graxos de baixa massa molecular (entre 6 e 9 carbonos) são mais inibidores que aqueles de alta massa molecular (em torno de 16 carbonos) (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 1999. PARAJO, 1998^B).

Além de substâncias provenientes da degradação das frações do material lignocelulósico, alguns íons de metais gerados pela corrosão de equipamentos podem ser inibidores. Por exemplo, os íons Zn^{2+} , Cd^{2+} e Co^{2+} são inibidores da enzima xilose desidrogenase, de destacada importância no metabolismo da xilose.

Adicionalmente, deve-se ressaltar que o efeito inibitório de algumas das substâncias enumeradas é potencializado pela presença de outras, como no caso do ácido acético e o furfural (PALMQVIST *et al.*, 1999), e pode ser diminuído com altas concentrações iniciais de biomassa (LARSSON *et al.*, 1998; BETANCUR, 2005).

2.6.3. Processos de Destoxificação

Diferentes processos têm sido propostos para diminuir a concentração de inibidores em hidrolisados hemicelulósicos. Os métodos para destoxificação do hidrolisado, a ser utilizado como meio de fermentação, variam de acordo com o tipo de inibidor presente. Entre os mais conhecidos encontram-se: mudanças de pH com CaO, Ca(OH)₂, H₂SO₄, utilização de carvão ativo, colunas de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, evaporação, peneiras moleculares, polieletrólitos e até enzimas (OLSSON & HAHN-HÄGERDAL, 1996; POUTANEN *et al.*, 1990; HAHN HÄGERDAL *et al.*, 1991 e 1998).

Cabe destacar que alguns tratamentos, apesar de se mostrarem eficientes na diminuição de inibidores, podem criar condições que afetam as características do meio e geram uma maior condição de stress ao microrganismo utilizado. Por exemplo, tratamentos com variações de pH podem desencadear aumentos excessivos na força iônica do meio. Adicionalmente, alguns tratamentos podem diminuir concentração de açúcares fermentáveis no hidrolisado, como tem sido comprovado com a utilização de carvão ativo (BRITO,2000).

A tendência tecnológica é suprimir estas etapas de destoxificação tendo em vista o fato de serem onerosas e resultarem nos conteúdos de glicídios. Neste contexto, uma estratégia interessante utilizada para minimizar o efeito inibitório refere-se à aclimatação do microrganismo ao meio, utilizando uma metodologia de cultivos sucessivos em meios que contenham gradativamente maiores concentrações de substâncias inibidoras (BETANCUR, 2005; PEREIRA JR.,2010). Essa metodologia tem permitido aumentos na concentração de etanol, produtividade e rendimento, em fermentações de resíduos de madeira pela levedura *Pichia stipitis* (NIGAM, 2001). A aclimatação apresenta-se então como uma metodologia que permite prescindir de etapas de destoxificação que representem custos elevados no processo global de produção de etanol a

partir de hidrolisados. Por esta razão um dos objetivos do presente trabalho foi permitir uma adaptação maior ainda, visando aumentar ainda mais as concentrações de etanol, produtividade e rendimento em fermentações de hidrolisado hemicelulósico.

2.7. Fermentação de Hidrolisados Hemicelulósicos

Como mencionado anteriormente, a hemicelulose compõe-se principalmente da pentose denominada xilose, que possui diversas aplicações industriais, como apresentado na Figura 2.12 porém, neste trabalho estabelece-se o uso desta pentose para a produção de etanol por via biotecnológica, sendo necessário aprofundar no processo de transformação deste açúcar em etanol através do metabolismo.

2.7.1. Metabolismo da Xilose

A conversão estequiométrica de xilose em etanol, esboçada na Figura 2.13, indica que para cada 3 moles de xilose podem se produzir como máximo teórico 5 moles de etanol, acompanhado do desprendimento do mesmo número de moles de CO₂. Em outras palavras, o rendimento máximo teórico do processo é de 0,51 g de etanol por cada 1,00 g de xilose. Na realidade, este rendimento não pode ser alcançado porque parte do substrato é desviado para o crescimento e manutenção da célula e para formação de outros subprodutos intrínsecos ao metabolismo.

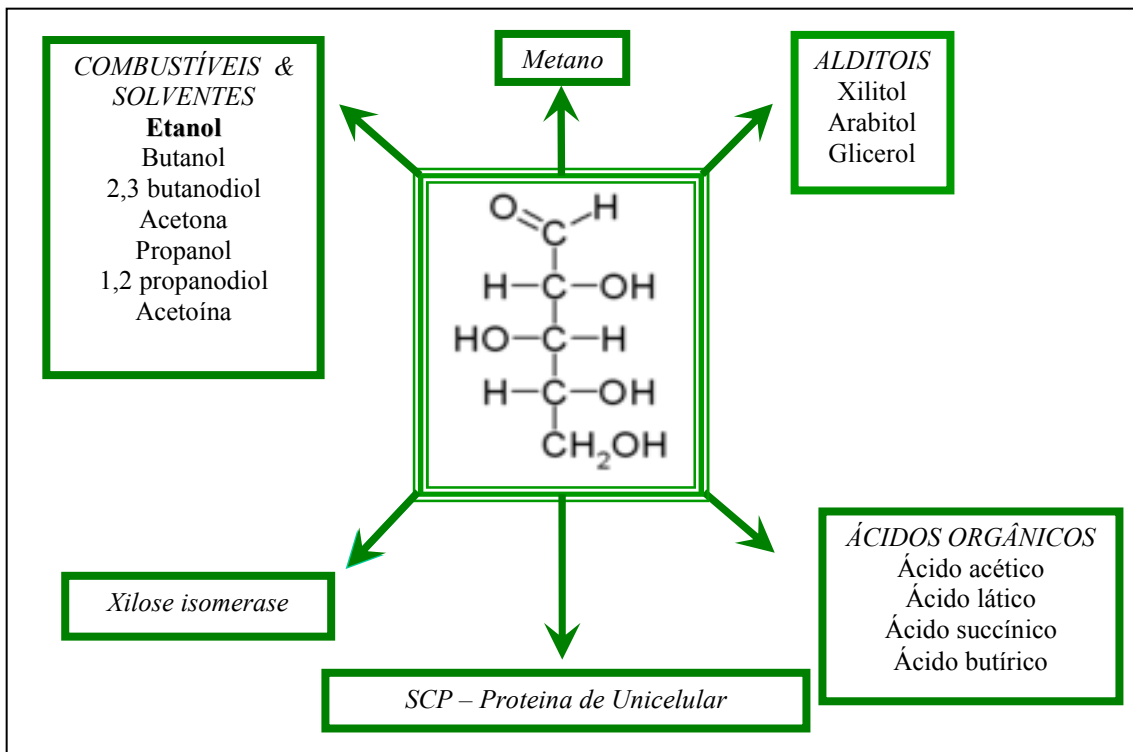


Figura 2.12. Produtos potenciais a partir de xilose.
Adaptado de PEREIRA JR.,1991.

A D-xilose pode ser utilizada como substrato potencial por diferentes tipos de microrganismos, tais como, bactérias, fungos filamentosos e leveduras. As bactérias degradadoras de D-xilose possuem a enzima xilose-isomerase capaz de converter essa pentose em D-xilulose, que é posteriormente fosforilada pela enzima xiluloquinase em D-xilulose-5-fosfato, um intermediário comum no metabolismo de células eucarióticas e procarióticas.

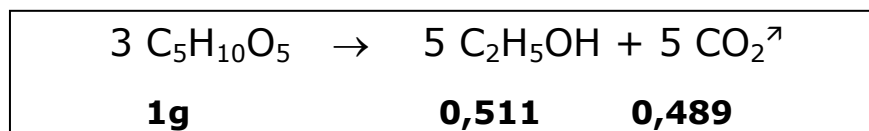


Figura 2.13. Reação global de conversão de D-xilose a etanol.

No caso de leveduras, a primeira reação do metabolismo da D-xilose (Figura 2.14) é a redução da D-xilose em xilitol, catalisada pela enzima xilose reductase (XR) dependente de coenzimas NADPH

ou NADH, segundo a linhagem. O xilitol pode ser, posteriormente, oxidado a D-xilulose pela ação da enzima xilitol desidrogenase (XDH) que requer a coenzima NAD⁺. Subseqüentemente, a fosforilação até D-xilulose-5-fosfato é catalisada pela enzima xilulose quinase com o consumo de ATP. Através da via Embden-Meyerhof-Parnas, o gliceraldeído-3-fosfato e a frutose-6-fosfato são convertidos em piruvato, com geração de NADPH necessário em outras etapas metabólicas. Em condições anaeróbicas, ou de baixa oxigenação, o piruvato é convertido em etanol através da catálise com duas enzimas (piruvato decarboxilase e álcool desidrogenase) e a reoxidação de NADH. Em condições de aerobiose o piruvato é oxidado através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Krebs) na cadeia respiratória (fosforilação oxidativa) (BRITO, 2000; BRÜINENBERG *et al.*, 1984; JEFFRIES, 2009; ISHCHUK *et al.*, 2008).

Sob condições de anaerobiose estrita ou de limitação de oxigênio, algumas leveduras degradadoras de D-Xilose, com XR dependente tanto de NADH como de NADPH, podem regenerar o NAD⁺ consumido na segunda reação do metabolismo. Esta dupla especificidade permite balancear o potencial redox em NAD⁺/NADH da XDH alterado pelo bloqueio da cadeia respiratória devida à ausência de oxigênio. Nestes casos, como exemplo a levedura *Pichia stipitis*, tem-se maior produção de etanol com um acúmulo de xilitol desprezível (MUSSATO & ROBERTO, 2002). A dupla especificidade da levedura *P. stipitis* também foi observada por SÁ (1993); ANTUNES (1997) e LEAL (1998).

Apresentam-se então as enzimas XR e XDH como catalisadores chave no metabolismo de xilose, sendo altamente dependentes de co-enzimas cuja regeneração está ligada ao processo respiratório celular. Desta forma, é importante determinar um nível de oxigênio que permita altas taxas de produção de etanol, concomitante, com

baixo crescimento celular, sem prejuízo da viabilidade e capacidade produtora da célula.

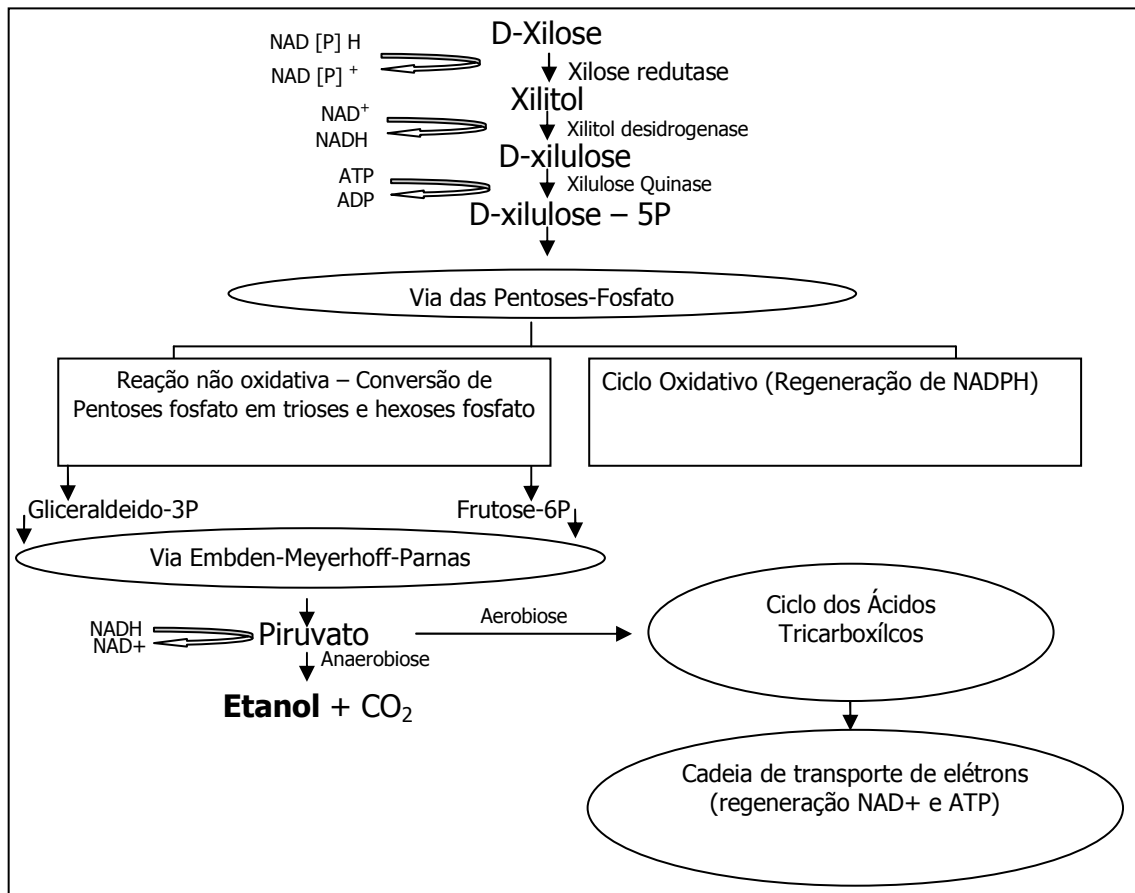


Figura 2.14. Metabolismo de D-xilose em leveduras.
Fonte: Adaptado de PARAJO (1998^A)

2.7.2. Microrganismos Fermentadores de Xilose

D-xilose pode ser degradada, visando à produção de etanol, por diferentes tipos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras naturalmente ocorrentes e/ou recombinantes, como pode ser observado na Tabela 2.5 (OLSSON & HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Entre as bactérias naturalmente ocorrentes, *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E apresenta um bom rendimento em etanol. Porém, as bactérias apresentam baixa tolerância ao etanol e a outros produtos indesejáveis como ácidos de pequena cadeia (ROSEMBERG, 1980).

Altos rendimentos em etanol têm sido reportados para fungos filamentosos, mas, com produtividades baixas. Esse motivo faz, do ponto de vista comercial, serem pouco atraentes em processos de fermentação alcoólica a partir de meios ricos em xilose.

No caso de leveduras, as mais eficientes fermentadoras de xilose são *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* e *Pichia stipitis* (BARNETT *et al.*, 1983). Além disso, o interesse no potencial biotecnológico das leveduras foi impulsionado pelo reconhecimento de características tais como facilidade de manuseio e de obtenção de grandes quantidades de massa celular, a habilidade de crescimento em uma ampla variedade de substrato, faixas de pH e taxas de oxigênio. As leveduras em um modo geral, são ainda consideradas seguras, sendo apenas umas poucas espécies patógenas oportunistas (ROSA & PETER,2006).

Para melhorar o desempenho dessas linhagens, quanto à produção de etanol, diferentes autores recomendam controlar a produção de xilitol e a assimilação do etanol, como no caso de *Pachysolen tannophilus*, em processos intimamente ligados com o controle rigoroso de oxigenação (LOHMEIER-VOGEL *et al.*, 1989; SKOOG *et al.*, 1992; AGBOGBO,2006).

Tabela 2.5. Desempenho de microrganismos fermentadores de xilose.

Espécie	Xilose (g/L)	Etanol (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)
Bactérias naturalmente ocorrentes				
<i>Bacillus marcerans</i> DMS 1574	20	3,3	0,16	0,03
<i>Bacteroides polypragmatus</i> NRCC 2288	44	6,5	0,15	0,09
<i>Clostridium saccharolyticum</i> ATCC 35040	25	5,2	0,21	0,05
<i>C. thermohydrosulfuricum</i> 39E	5	2,0	0,39	
Bactérias recombinantes^a				
<i>Escherichia coli</i> B, pLOI297 (pdc, adhB)	80	39,2	0,49	0,70
<i>E. coli</i> B KO11 (pdc, adhB, frd)	80	41,6	0,52	0,87
<i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1 (pdc, adhB)	100	46,0	0,46	0,96
<i>K. planticola</i> SDF20 (pdc, pfl)	17	7,7	0,44	0,18
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4 (Pzb5)	25	11	0,44	0,57
Leveduras naturalmente ocorrentes				
<i>Candida shehatae</i> CBS 4705	50	24,0	0,48	0,19
<i>C. shehatae</i> CSIR-Y492	90	26,2	0,29	0,66
<i>C. sp.</i> CSIR-62 A/2	50	20,1	0,40	0,42
<i>C. tenuis</i> CBS 4435 (11) ^b	20	6,4	0,32	0,03
<i>Clavispora sp.</i> UWO(PS) 83-877-1 (11) ^b	20	5,9	0,30	0,11
<i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460 (eth) ^c		10	0,29	0,14
<i>P. tannophilus</i> RL 171	50	13,8	0,28	0,28
<i>P. segobienseis</i> CBS 6857	20	5,0	0,25	0,02
<i>P. stipitis</i> CBS 5773 (5) ^b	20	5,9	0,30	0,02
<i>P. stipitis</i> CBS 5774	50	18,5	0,49	0,55
<i>P. stipitis</i> CBS 5775	25	7,75	0,31	0,38
<i>P. stipitis</i> CBS 5776	50	22,3	0,45	0,34
<i>P. stipitis</i> CBS 5774 ^d	60	25,8	0,38	0,97
<i>P. stipitis</i> CBS 5774 ^d	120	38,9	0,32	1,10
Leveduras recombinantes^a				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (XYL 1, XYL 2)	21,7	1,6	0,07	0,07
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (xyl A)	50	21,0	0,42	0,19
Fungos filamentosos				
<i>Fusarium avenaceum</i> VTT-D-80146 (5) ^b	50	12,0	0,24	0,07
<i>F. clamydosporum</i> VTT-D-77055	50	11,0	0,22	0,07
<i>F. culmorum</i> VTT-D-80148 (3) ^b	50	12,0	0,24	0,07
<i>F. graminearum</i> VTT-D-	50	11,0	0,22	0,07
<i>F. lycopersici</i> ATCC 16417	50	16,0	0,32	0,17
<i>F. oxysporum</i> VTT-D-80134 (3) ^b	50	25,0	0,50	0,17
<i>F. sambucium</i> VTT-D-77056	50	13,0	0,26	0,08
<i>F. solani</i> VTT-D-77057	50	11,0	0,22	0,07
<i>Monila sp.</i>	50	12,6	0,25	0,08
<i>Paecilomyces sp.</i> NFI ATCC 20766	100	39,8	0,40	0,24

^a Os genótipos relevantes estão dentro dos parênteses, sendo: pdc, piruvato descarboxilase; pfl, piruvato formatolase; adhB, álcool desidrogenase II; frd, fumarato redutase; pZB5 carrega os genes de xilose isomerase, xiluloquinase, transcetolase e transaldolase; XYL 1, xilose redutase; XYL 2, xilitol desidrogenase; xyl A, xilose isomerase

^b Os parênteses denotam o número de linhagens investigadas

^c microrganismo mutante

^d BETANCUR (2005)

Fonte: OLSSON & HAHN-HÄGERDAL (1996); BETANCUR (2005)

Saccharomyces cerevisiae tem sido utilizada para metabolizar xilose na presença de xilose isomerase, enzima que transforma esta pentose em xilulose, que pode ser facilmente consumida por esta levedura. Porém, existe uma incompatibilidade entre a temperatura e pH de atuação da enzima e do microrganismo (OLSSON & HAHN-HÄGERDAL, 1996; MATSUSHIKA *et al.*, 2009).

2.7.3. Fatores Ambientais que Afetam a Fermentação de Xilose

Além de escolher um microrganismo apropriado para o processo de fermentação, é de crucial importância determinar a composição do meio favorável ao processo e as condições da fermentação que permitam obter os melhores resultados. Nesse sentido, são apresentados, a seguir, alguns parâmetros mais relevantes ao processo de fermentação alcoólica a partir de xilose.

2.7.3.1. Grau de Aeração

Como destacado, o suprimento de oxigênio é um dos fatores ambientais mais importantes na fermentação alcoólica de xilose por leveduras, influenciando o crescimento celular, o rendimento e a produção de etanol, assim como a formação de produtos. Isto indica que a taxa de aeração é determinante na quantidade de carbono utilizada pela célula para crescimento celular ou formação de etanol, existindo um nível de oxigenação que levaria ao alto rendimento e produtividade em etanol, coincidentes com baixo rendimento em biomassa (SCHNEIDER, 1989; RIZZI *et al.*, 1989).

Este comportamento foi confirmado para *Pichia stipitis* quando GUEBEL *et al.* (1991) verificaram a impossibilidade de otimizar a produção de biomassa e a formação de produto com um único valor de taxa de

transferência de oxigênio (OTR), sendo apropriado um processo aeróbio para o crescimento celular e condições microaeróbias para maximizar a produtividade em etanol. Adicionalmente, tanto para a levedura mencionada como para *Pachysolen tannophilus* e *Candida shehatae*, tem se reportado baixo requerimento de oxigênio para obter uma máxima produção de etanol e, em caso contrário, acúmulo de xilitol ou reassimilação do mesmo (HANH-HÄGERDAL *et al.*, 1991).

A oxigenação, como discutido anteriormente, é necessária para manter o balanço redox nas diferentes reações envolvidas na degradação de xilose e na manutenção do microrganismo. Além disso, publicações sinalizam como necessária uma oxigenação adequada para o transporte eficaz de xilose e para algumas funções mitocondriais (SKOOG *et al.*, 1992).

2.7.3.2. pH

Os rendimentos em etanol são fortemente afetados pelas variações de pH. No caso da levedura *Candida shehatae* CBS 2779 tem sido reportado uma produtividade volumétrica máxima utilizado um intervalo de pH entre 4 e 5 (DU PREEZ *et al.*, 1986^A). Para *Pichia stipitis* CBS 716, o intervalo está entre 4,5 e 6, sendo este último valor de pH o mais apropriado (SLININGER *et al.*, 1990). No caso de *Pachysolen tannophilus* altas produtividades são possíveis numa faixa entre 2,5 e 5,0 (SLININGER *et al.*, 1985).

É importante ressaltar que o pH ótimo para o crescimento e/ou produção de etanol é função direta do microrganismo estudado. Porém, as discrepâncias no comportamento do microrganismo em função do pH e os valores ótimos, reportados na literatura, podem ser atribuídos a outras condições de processo, ao tipo de controle de pH e/ou à metodologia

empregada para o cálculo de parâmetros comparativos (DU PREEZ *et al.*, 1994; KASTNER *et al.*, 1996).

2.7.3.3. Temperatura

Tem-se demonstrado que, em um intervalo de temperatura entre 30°C e 32°C, obtém-se a concentração de etanol máxima em fermentação com *Pichia stipitis* CBS 7126 (SLININGER *et al.*, 1990). Tanto em fermentações empregando *P. stipitis* como *Candida shehatae* CBS 2779 reporta-se uma acentuada diminuição na formação de produto com o aumento de temperatura a valores acima do ótimo (30°C), assim como diferentes intervalos ótimos de produção para etanol e xilitol, sendo a formação dessa última substância mais sensível aos aumentos de temperatura (BARBOSA *et al.*, 1990). Cabe destacar que a temperatura ótima do processo não só depende da linhagem, mas também, do substrato utilizado (glicose e/ou xilose), sua concentração e da presença de outros compostos.

2.7.3.4. Concentração de Substrato

O consumo de xilose é fortemente influenciado pela concentração inicial desta pentose em fermentações realizadas com *Pichia stipitis* e *Candida shehatae*. Em investigações realizadas com *P. stipitis* Y 7124, encontrou-se que o rendimento em etanol permanecia constante entre 20 e 110 g/L. Embora não tenha sido verificado acúmulo de xilitol em concentrações acima dos 110 g/L, tem se reportado rendimentos gradativamente menores (LAPLACE *et al.*, 1991b). Segundo ROBERTO *et al.* (1991), em investigações com *P. stipitis*, a levedura inibe-se em fermentações com concentrações iniciais entre 76g/L e 99 g/L, sendo o rendimento em etanol afetado para concentrações acima de 145 g/L.

Adicionalmente, existem notificações que afirmam que o acúmulo de xilitol durante fermentações com leveduras obedece mais as condições ambientais, como a disponibilidade de oxigênio e alta densidade celular, do que à concentração inicial de substrato (DU PREEZ *et al.*, 1986^B).

Outros autores reportam que a levedura *Pichia stipitis* CBS 5773, apresenta uma queda no seu rendimento em etanol de 0,41 para 0,39 g/g, quando aumentada a concentração de xilose de 50 para 200 g/L (SLININGER *et al.*, 1985). No caso da linhagem *P. stipitis* CBS 5774, concentrações entre 80 e 100g/L de xilose foram reportadas como as melhores para a bioconversão de xilose em etanol, mas, constatou-se uma diminuição drástica nos valores dos parâmetros de fermentação para concentrações acima de 150 g/L (ANTUNES, 1997).

2.7.3.5 Concentrações de Etanol

A tolerância das leveduras ao etanol é de vital importância para alcançar altos níveis de produção e viabilizar a destilação do meio fermentado. Essa tolerância difere para cada linhagem de levedura, sendo afetada pelas condições de cultivo, especialmente, pela temperatura (DU PREEZ *et al.*, 1987).

Em fermentações realizadas com várias linhagens de *Candida shehatae* e com *Pichia stipitis* Y633 (CBS 7126), conduzidas em batelada alimentada com baixo nível de oxigenação, o crescimento celular foi sensível ao efeito inibitório do etanol adicionado. As linhagens *P. stipitis* Y633 (CBS 7126), *C. shehatae* CSRI Y633 e *C. shehatae* CSRI Y492, apresentaram-se como as melhores produtoras, alcançando concentrações entre 44 g/L e 47 g/L de etanol (DU PREEZ *et al.*, 1989).

Em investigações realizadas com *Pichia stipitis* NRRL Y7124, encontrou-se uma tolerância ao etanol dependente da fonte de carbono (glicose ou xilose). Esta relação entre a tolerância e a fonte de carbono foi

estudada a partir do crescimento e a atividade da ATPase presente na membrana plasmática para cultivos com glicose ou xilose, sendo melhores as atividades apresentadas em processos realizados utilizando a hexose (MEYRIAL *et al.*, 1995). Nessa mesma linhagem, em estudos realizados para avaliar o efeito do etanol, foi observado que, na medida em que se aumenta a concentração desse produto no meio, o rendimento em xilitol, soluto compatível ao efeito inibidor, aumenta linearmente e, conseqüentemente, apresenta-se uma diminuição proporcional no rendimento em etanol (DELGENES *et al.*, 1988, JEFFRIES *et al.*, 2006).

2.8. Considerações Gerais

O aproveitamento de matérias lignocelulósicos para a produção de etanol, por via biotecnológica, apresenta-se como uma tecnologia apropriada à demanda mundial por novas alternativas energéticas que substituam as tradicionais fontes fósseis. Porém, ainda não tem sido alcançado um amadurecimento no processo, que permita a sua viabilidade técnica, econômica e ambiental e, conseqüentemente, sua implementação a nível industrial em todo o planeta.

Sendo assim, se faz necessário um maior desenvolvimento do processo de separação seletiva da fração hemicelulósica e da transformação dos seus açúcares em etanol. No caso da separação seletiva, a literatura sinaliza à hidrólise ácida como a metodologia mais eficiente para a obtenção dos açúcares constituintes, sendo necessária a investigação da diminuição da proporção de ácido utilizada, como o objetivo de minimizar a geração de resíduos no processo e diminuir a produção de inibidores que afetam o processo de biotransformação. Outra alternativa plausível é a busca por microrganismos mais adaptados as condições do processo, tolerando concentrações maiores de inibidores celulares. Até o presente momento, dos microrganismos conhecidos, o

mais promissor pra o referido bioprocesso seria a levedura *Pichia stipitis*, sendo interessante explorar a capacidade aclimatativa deste microrganismo a fermentação de xilose na presença destes inibidores através de pressão seletiva, capacidade esta previamente observada através de estudos anteriores onde a necessidade de uma aclimação prévia mostrou-se primordial. Desta Forma, este fenômeno de aclimação mostra-se como um mecanismo celular interessante para ser estudado e é amplamente visualizado na natureza (HAGLER, 2009).

Aclimação, ou aclimatização são termos gerais usados para descrever o processo de um organismo ajustar-se a mudanças em seu habitat, geralmente envolvendo temperatura ou clima (meio ambiente). Aclimação usualmente ocorre por um curto período, e dentro do período de vida de um organismo (NAVAS & CRUZ-NETO, 2008).

Este fenômeno biológico é bastante complexo, envolvendo vários eventos e mecanismos. No entanto, nas células, existem respostas fisiológicas que, seguramente, se alteram quando expostas a ambientes em que elas não estão "acostumadas", como, por exemplo, (síntese de determinados transportadores específicos; aumento na síntese de enzimas responsáveis pela utilização daquele(s) nutriente(s) (as ditas enzimas induzidas); aquisição de resistência a substâncias tóxicas; estresse osmótico, hipoxia, estresse ao oxigênio etc. Trabalhos desenvolvidos por SORIANO (1998); GOMES (2008) abordam esta importante característica biológica.

Aclimação não deve ser confundida com adaptação, que ocorre em populações durante sua evolução; Além disso, a adaptação envolve modificações genéticas herdáveis como, por exemplo, o operon ara e lac que codificam genes para o metabolismo de arabinose e lactose, respectivamente e são amplamente estudados em *E.coli*. Entretanto, estes genes são codificados apenas na ausência de glicose e quando as células não são submetidas frequentemente à meios onde sejam forçadas a expressar esses genes, não raramente perdem a capacidade de codificá-

los por não serem repassados para as células filhas durante a duplicação do DNA (NELSON & COX, 2002). Estas modificações genéticas herdáveis, em geral não ocorrem na aclimação. Este fenômeno é reportado para *Saccharomyces cerevisiae* relacionado a capacidade de aclimação a baixas temperaturas de cultivo, chegando a obter uma taxa de crescimento quando incubadas à 12°C semelhantes quando comparada ao crescimento à 30°C, que é conhecidamente a temperatura ótima de crescimento para esta espécie (TAI *et al.*, 2007). Sendo assim, é possível observar que este fenômeno de aclimação é de extrema importância em diversos sistemas biológicos e se devidamente explorados podem apresentar aplicação industrial em inúmeros bioprocessos, como por exemplo, no caso do presente trabalho que exhibe o potencial tecnológico deste fenômeno de aclimação para *P.stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de Cana-de-açúcar não destoxificado.

CAPÍTULO 3

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1. Justificativa

O esgotamento das reservas de petróleo tem ocasionado o aumento excessivo no preço dos combustíveis tradicionais, assim como em outros produtos derivados do petróleo. Esta problemática, afetada igualmente pela crescente demanda mundial de energia e a fragilidade política dos países com as maiores reservas, tem aumentado notavelmente o interesse pela substituição dos combustíveis tradicionais por biocombustíveis, dentre os quais o etanol apresenta-se como uma das alternativas mais promissoras.

O uso de etanol como combustível não só apresenta-se como uma alternativa tecnicamente apropriada, mas também, possui importância ecológica por ser este um combustível cujo processo de combustão gera baixas emissões de poluentes e, levando em consideração sua característica renovável, não contribui para o desbalanceamento no ciclo do carbono.

No Brasil, segundo maior produtor e primeiro exportador mundial de etanol, assim como detentor da tecnologia de produção de menor custo, utiliza-se o suco extraído da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção do biocombustível. Este processo encontra-se acompanhado da geração de grandes quantidades de material lignocelulósico, o bagaço, que pode ser utilizado para a produção de etanol se desenvolvidos processos que permitam a extração integral dos açúcares constituintes, como proposto dentro do conceito de "Biorrefinaria". Com a implementação deste tipo de processo, algumas estimativas estabelecem que a produção de etanol no Brasil poderia ser duplicada, sem a necessidade de aumentar as áreas de cultivo da cana-de-açúcar.

Sob esta panorâmica, faz-se evidente a importância do desenvolvimento de processos de produção de etanol a partir do bagaço de cana, que envolvam baixos custos e altas produtividades. É neste contexto que realiza-se esta dissertação, visando estudar o aproveitamento mais eficiente de uma das frações do bagaço, a hemicelulose, para bioprodução de etanol por *P.stipitis*. Com isto, dá-se continuidade aos trabalhos previamente desenvolvidos por PEREIRA JR. e colaboradores, nos laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da UFRJ.

3.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de um bioprocessos mais eficiente, através de aclimações sucessivas das células de *P.stipitis*, para produção de etanol no qual seja aproveitada a xilose, a partir do hidrolisado hemicelulósico não destoxificado extraída por hidrólise com ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar. Para isso foi utilizado como agente microbiano uma linhagem da levedura flocculante *Pichia stipitis* CBS5774 utilizada desde a década de 70 (Denominada agora por *Pichia stipitis* LADEBIO 01) pelo Laboratório de Desenvolvimento de

Bioprocessos que após observar se uma robustez ao hidrolisado hemicelulósico, tencionou-se explorar este fenômeno, sendo então aclimatada a concentrações gradativas de hidrolisado e finalmente comparada com o desempenho da linhagem de *Pichia stipitis* CBS5774 recém importada, para o mesmo processo, nas mesmas condições no intuito de evidenciar diferenças nos perfis cinéticos entre estas duas linhagens tanto para crescimento celular quanto para o perfil cinético de fermentação alcoólica utilizando apenas o hidrolisado hemicelulósico não destoxificado como substrato.

Para alcançar o objetivo descrito, foram formulados os objetivos específicos:

- Levantar os perfis cinéticos de crescimento das duas estirpes de *Pichia stipitis* em meios de propagação onde a fonte de carbono seja exclusivamente oriunda do hidrolisado hemicelulósico.
- Melhorar o desempenho da produção celular utilizando meios de hidrolisado hemicelulósico através de pressão seletiva, isto é, realização de repiques sucessivos em concentrações gradativamente superiores de hidrolisado e conseqüentemente maiores concentrações de inibidores celulares.
- Melhorar o desempenho da fermentação de hidrolisado hemicelulósico através da utilização das células submetidas à pressão seletiva supracitada (aclimatação).
- Estudar o efeito e tolerância aos inibidores celulares (ácido acético, furfural e HMF) para o crescimento celular e posteriormente para a

fermentação do hidrolisado em meio sintético adicionado de concentrações pré-definidas destes componentes tóxicos à célula.

- Hierarquizar a influência de cada um dos inibidores celulares abordados no presente estudo tanto para crescimento celular quanto para fermentação alcoólica em hidrolisado hemicelulósico não destoxificado.
- Comprovar a maior eficiência no desempenho da fermentação em hidrolisado hemicelulósico não destoxificado pela linhagem *P.stipitis* LADEBIO 01 em relação à linhagem *P.stipitis* CBS5774 através de ensaios de fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos nas mesmas condições.
- Buscar diferenças moleculares entre as duas linhagens através de técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase para região ribossomal (D1/D2 26S rDNA) e Região espaçadora Intergênica (ITS).

CAPÍTULO 4

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste Capítulo são apresentados os materiais utilizados para o desenvolvimento da pesquisa, assim como as diferentes metodologias aplicadas nos experimentos realizados. Foram estabelecidos: os microrganismos utilizados, as condições e metodologias para obtenção do hidrolisado, características dos processos de fermentação, a metodologia analítica empregada, os planejamentos experimentais do tipo central composto, assim como a extração do DNA e amplificação por PCR (***Polymerase Chain Reaction***).

4.1. Microrganismos

Para todos os processos fermentativos da xilose, utilizou-se 2 diferentes amostras da linhagem floculante da levedura *Pichia stipitis* CBS5774, proveniente do banco de linhagens holandês "Central Bureau voor Schimmelcultures-CBS". Esta levedura foi previamente catalogada

como o microrganismo mais adequado para conversão de D-xilose a etanol (PEREIRA Jr., 1991). Sendo a primeira delas utilizada desde a década de 70 para desenvolvimento de Bioprocessos, coordenados pelo Professor Nei Pereira Jr., sendo a partir de então denominada *Pichia stipitis* LADEBIO01 e a segunda recentemente importada para fins comparativos, sendo denominada como *Pichia stipitis* CBS5774. Na Figura 4.1 é apresentada uma microfotografia da estirpe LADEBIO 01, onde pode ser claramente apreciada a formação de agregados, devido à sua característica floculante.

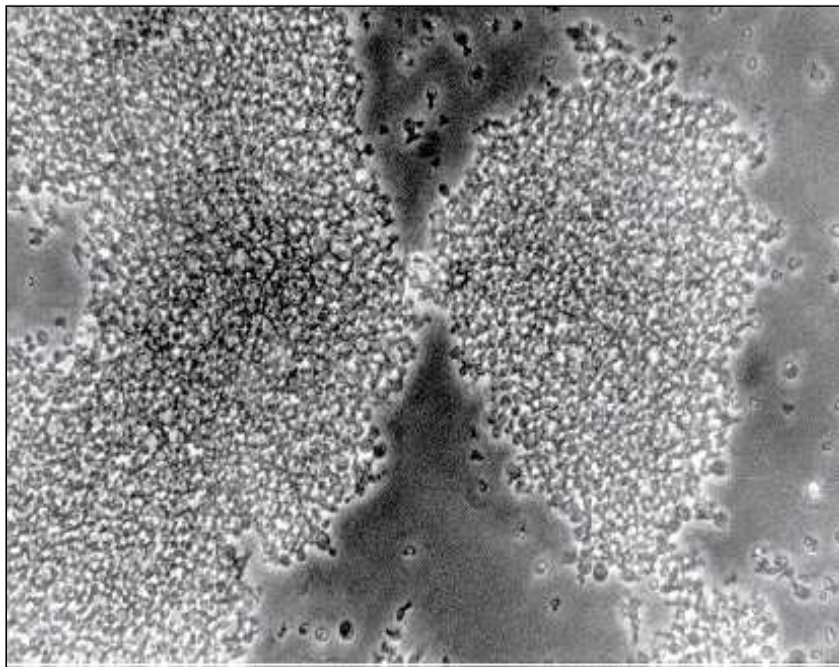


Figura 4.1. Observação microscópica da linhagem floculante de *Pichia stipitis* CBS 5774 (aumento de 400 vezes)

Fonte: PEREIRA JR., 1991.

4.1.2. Manutenção do Microrganismo

A manutenção da levedura *P. stipitis* foi realizada como recomendado por PEREIRA Jr. (1991). A cultura estoque foi conservada em meio agarizado, cuja composição esta descrita na Tabela 4.1, deixando-se incubar pelo período de três dias a uma temperatura controlada de 30°C para, posteriormente, ser estocada a 5°C.

Tabela 4.1. Meio de manutenção.

Componente	Concentração (g/L)
D-xilose	5,0
Peptona	5,0
Extrato de levedura	2,0
Ágar-ágar	30,0

(PEREIRA Jr., 1991)

4.2. Obtenção do Hidrolisado Hemicelulósico

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado para o desenvolvimento deste trabalho foi gentilmente cedido pela usina Costa Pinto de Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Inicialmente, o material foi submetido a secagem a 60°C, com o único interesse de garantir uma estocagem sem perigo de contaminação com fungos, em seguida cominuído no moinho MF 10 Basic (IKE WERKE®) melhorando a eficiência da hidrolise ácida. Cabe ressaltar que o processo de secagem é utilizado como uma etapa prática no trabalho de laboratório, não sendo uma etapa obrigatória para o aproveitamento do material lignocelulósico a nível piloto ou industrial.

A hidrólise do bagaço, inicialmente, foi realizada segundo as condições otimizadas por BETANCUR & PEREIRA JR. (2010) na qual foram mantidas as condições de pressão e tempo (1 atm (121°C) durante 27

minutos), relação sólido:líquido (1:2,8 (g:mL)), e concentração da solução ácida (H_2SO_4) de 1,09%.

A estratégia para misturar o bagaço ao ácido foi realizada conforme o melhor desempenho descrito por BETANCUR & PEREIRA JR. (2010), na qual a solução ácida foi impregnada no bagaço seco por dispersão, utilizando para isto um borrifador manual. O procedimento realiza-se cuidadosamente, garantindo a maior homogeneidade possível da mistura sólido-líquido.

Após o processo térmico de hidrólise e separação da matriz sólida através de uma prensa hidráulica para extração do hidrolisado, conforme ilustra a Figura 4.2, o hidrolisado teve seu pH ajustado até 6,0 mediante a adição de $Ca(OH)_2$ sob banho de água e gelo para evitar aquecimento da solução com o calor gerado durante esta etapa. Após ajuste de pH, a suspensão foi filtrada a vácuo, para retirar o precipitado formado, e estocada, apropriadamente em geladeira, para ser utilizada como base do meio de crescimento celular e fermentação nos experimentos realizados no presente estudo.



Figura 4.2. Prensa Hidráulica para Extração do Hidrolisado.

4.3. Meios Empregados para Ativação, Propagação e Fermentação

Quando empregado o cultivo de ativação (meio semi sintético) como etapa inicial, as células foram primeiro ativadas em meio líquido e posteriormente propagadas.

4.3.1. Meio de Ativação

O meio utilizado para a ativação das células (primeira etapa de crescimento) foi o mesmo empregado por PEREIRA Jr. (1991) e sua composição está apresentada na tabela 4.2.

A solução de sais minerais e ácido cítrico, referidas na Tabela 4.2 é uma solução concentrada de oligoelementos utilizada para suplementar todos os meios (ativação, propagação e fermentação). A composição dessa solução pode ser observada na Tabela 4.3.

Tabela 4.2. Composição do meio utilizado para ativação das células

Componentes	Concentração
D-xilose	20,0 g/L
Uréia	1,25 g/L
KH ₂ PO ₄	1,1 g/L
Extrato de levedura	2,0 g/L
Solução de sais minerais e ácido cítrico	40,0 mL/L

(PEREIRA Jr., 1991)

A fim de se evitar reações indesejadas entre a xilose e outros componentes do meio, foram preparadas e esterilizadas (0,5 atm/20 min) separadamente, uma solução contendo a fonte de carbono e outra com os demais componentes, de modo que a primeira solução representasse 25% do volume total. Para cada solução o pH foi ajustado próximo de 6,0 utilizando solução de NaOH (2M) ou HCl (2M), conforme fosse necessário.

Tabela 4.3. Composição da solução de sais minerais e ácido cítrico.

Componente	Concentração (g/L)	Componente	Concentração (g/L)
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,5	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Ácido cítrico	12,5	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,035
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,9	H ₃ BO ₃	0,050
MnSO ₄	0,19	KI	0,009
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,30	Al ₂ (SO ₄) ₃	0,0125

(PEREIRA Jr., 1991)

4.3.2. Meios para Propagação Celular

4.3.2.1 Meios para Propagação Celular em Meio Semi Sintético

Primeiramente o processo de propagação celular foi realizado em meio semi sintético (este meio de cultivo é denominado desta forma, uma vez que a composição química exata do extrato de levedura presente no meio é desconhecida) para as duas linhagens, contendo xilose comercial. A primeira dessas foi submetido a fermentação de meio semi sintético para avaliar o comportamento fermentativo da xilose de ambas linhagens na ausência de inibidores celulares provenientes do hidrolisado hemicelulósico. Posteriormente, foi realizado a propagação celular em meio semi sintético para avaliar o comportamento fermentativo no hidrolisado hemicelulósico das duas linhagens sem as prévias aclimação em duas etapas (25% e 50% de hidrolisado), que de acordo com BETANCUR (2005) são requeridas para um comportamento fermentativo eficiente.

4.3.2.2 Meios para Propagação Celular em Hidrolisado Hemicelulósico

O processo de propagação celular para obtenção do inóculo para fermentação com aclimação padronizada de acordo com BETANCUR (2005) foi realizado utilizando a mesma proporção de oligoelementos e nutrientes descritos para o cultivo de ativação. Porém, a solução de xilose foi substituída por hidrolisado não estéril, numa proporção de 25% do volume total na primeira etapa e outra de 50% do volume total.

Este processo foi realizado para ambas estirpes de *Pichia stipitis*, servindo como passo inicial para explorar ainda mais a capacidade aclimatativa da estirpe LADEBIO 01 ao hidrolisado hemicelulósico, após repiques sucessivos no hidrolisado e para o conhecimento do perfil de fermentação da linhagem CBS 5774 recém importada neste mesmo meio.

4.3.3. Meios de Fermentação

4.3.3.1. Meio Semi Sintético

Para o preparo do meio semi sintético utilizado para fermentação foi adotada a mesma sistemática descrita para o meio de ativação, mudando apenas a concentração de xilose para 50g/L, uma vez que nas condições de hidrólise realizada a concentração de xilose encontra-se em cerca de 50g/L, foram mantidas as concentrações de fontes de nitrogênio e oligoelementos sumarizada na Tabela 4.2.

4.3.3.2. Hidrolisado Hemicelulósico

Nas fermentações utilizando hidrolisado, foram mantidas as proporções de oligoelementos e fontes de nitrogênio descritas na Tabela 4.2. Nesse sentido, misturou-se as fontes de nitrogênio e de fosfato ao

volume de solução de sais a ser adicionado, sendo esterilizado por filtração em membrana com porosidade de 0,22 μm , evitando a precipitação do mesmo ao ser submetido à autoclavação.

4.4. Metodologias de Propagação Celular

4.4.1. Metodologia de Propagação Celular para *P.stipitis* CBS 5774

As células foram, inicialmente, ativadas em meio líquido sintético, de acordo com a seguinte metodologia: do repique em meio de manutenção foi retirada uma alçada de células, para um frasco cônico de 500 mL contendo 200 mL de meio de ativação, e posteriormente incubado a 30°C em agitador rotatório utilizando uma velocidade da agitação de 250rpm, por 24h, tempo necessário para que as células alcançassem uma concentração apropriada. Posteriormente, 2 diferentes condições foram realizadas:

a) Uma alíquota de 10 mL foi utilizada como inóculo em um número de frascos que garantisse a obtenção do inóculo para fermentação. Esta propagação celular foi realizada segundo as condições descritas anteriormente com intuito de fermentar meio sintético. Posteriormente, este procedimento foi repetido para fermentar o hidrolisado hemicelulósico sem aclimação das células (perfil cinético não exibido).

b) Uma alíquota de 10 mL foi utilizada como inoculo em um frasco cônico de 500 ml contendo a composição exibida na tabela 4.2, porém a xilose comercial foi substituída por 25% de volume de hidrolisado, caracterizando a primeira aclimação, em seguida, uma alíquota de 10mL foi inoculada em frascos contendo 50% de hidrolisado (segunda aclimação), sob as condições de cultivo previamente descritas. Finalmente, estas células aclimatadas foram utilizadas para fermentação do hidrolisado afim de verificar o perfil de fermentação desta linhagem recém importada que ate então era desconhecido nessas condições.

Previamente a fermentação o volume foi reunido ao final do processo e centrifugado (2000 g/10 min) para separar a massa celular a ser utilizada como inóculo da fermentação. As células centrifugadas foram, posteriormente, ressuspensas no meio de fermentação assepticamente visando uma concentração inicial de células em torno de 5g/L.

4.4.2. Metodologia de Propagação Celular para *P.stipitis* LADEBIO01 – Melhoramento da Linhagem Através de Aclimações Sucessivas

Após realizado o cultivo de ativação nas mesmas condições da linhagem CBS5774 foram realizados 50 cultivos onde a concentração de hidrolisado foi sendo aumentada gradativamente e perfil de fermentação monitorado a cada 10 repiques.

A composição do meio segue conforme a tabela 4.2, entretanto a xilose utilizada foi oriunda do hidrolisado estéril por autoclavagem a 0,5atm durante 5 minutos, visando evitar a contaminação das passagens. Os primeiros 10 repiques os meios continham a concentração de 25% de hidrolisado, sendo então passados para 50% (20 repiques sussecivos) de hidrolisado e após o 30º, 35º, 40º, 45º repiques, as concentrações foram aumentadas para 60%, 70%, 80% e 90% de hidrolisado respectivamente. Todos os cultivos foram realizados em duplicata e a cada 3 passagens foi realizado um repique em dois meios sólidos, com intuito de averiguar a pureza da cultura. Estes meios contem a mesma formulação do meio líquido, sendo apenas adicionado Agar e a fonte de carbono foi substituída em um dos meios por glicose e outra mantida xilose. Uma vez que uma quantidade menor de microrganismos utilizam a xilose como fonte de carbono, foi utilizado em paralelo o meio utilizando glicose para garantir a detecção, caso houvesse de microrganismos contaminantes.

Para averiguar a esterilidade do hidrolisado, o mesmo foi autoclavado também por 1, 5 e 10 minutos, tanto a 0,5 quanto a 1atm (111°C e 121°C, respectivamente) e em seguida, testado sua esterilidade por incubação em meio contendo 25% de hidrolisado e em placas de petri com o mesmo meio utilizado para manutenção de *P.stipits*.

Os cultivos sucessivos foram realizados em frascos cônicos de 250mL, contendo um volume reacional de 50mL, com o período de incubação de 48h à 30°C sob agitação de 200rpm. Os cultivos em meio sólido foram realizados em placas de petri, com o período de incubação de 48h à 30°.

A cada 10 repiques um volume de meio para obtenção de uma concentração celular suficiente para realizar uma fermentação foi preparado e previamente a fermentação o volume foi reunido ao final e centrifugado (2000 g/10 min) para separar a massa celular a ser utilizada como inóculo da fermentação. As células centrifugadas foram, posteriormente, ressuspensas no meio de fermentação assepticamente visando uma concentração inicial de células em torno de 5g/L.

4.5. Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico em Biorreator Instrumentado

As fermentações foram realizadas em biorreator tipo Biostat.B (B. Braun Biotech International), empregando um vaso reacional de 1,5L, contendo 600mL de meio de fermentação suplementado com os nutrientes do meio sintético, com exceção de xilose, nas mesmas concentrações. O processo foi controlado automaticamente a uma temperatura de 30°C, agitação de 250 rpm, uma relação de aeração de 0,03 vvm e pH 6,0 mediante a adição de NaOH (2M) ou HCL (2M), utilizando uma concentração celular inicial de aproximadamente 5 g/L. A cada 4h de fermentação foram amostradas alíquotas de 2mL com auxílio

de pipetas estéreis, que foram primeiramente analisadas em espectrofotometria para quantificação de concentração celular e posteriormente centrifugadas a 2000 g/10 min para quantificação, em HPLC, dos açúcares e produtos de fermentação contidos no sobrenadante, sendo neste estudo o etanol o produto de interesse.

Como controle positivo, foi realizado a fermentação em Meio sintético, contendo Xilose comercial como fonte de carbono em concentrações similares ao obtido no hidrolisado. Como controle negativo foi realizado uma fermentação sem aclimação ao hidrolisado. Posteriormente foram realizadas as fermentações da linhagem realizando a aclimação padrão em 3 etapas (meio sintético, meio contendo 25% e posteriormente 50% de hidrolisado) conforme descrito por PEREIRA JR (1991). Finalmente fermentações após o 10^o, 20^o, 30^o e 40^o repique foram realizadas. A figura 4.3 Ilustra o processo supracitado nos itens 4.4.2 e 4.5.

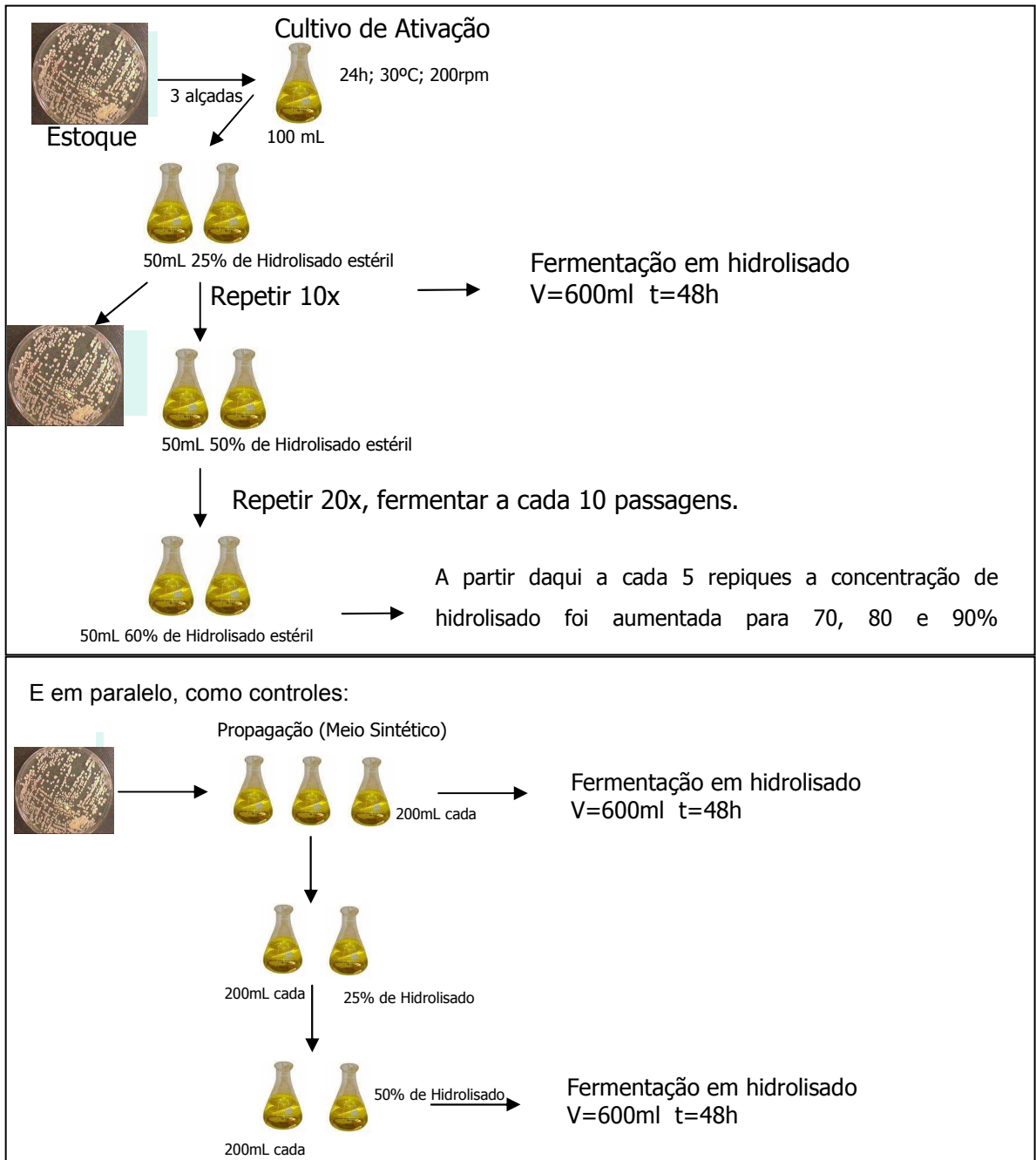


Figura 4.3. Sequência da metodologia empregada para a aclimação da levedura *P.stipitis* LADEBIO 01.

4.6. Amostragem

Nos experimentos realizados utilizando *P.stipitis* para fermentar a xilose contida em hidrolisado, foram retiradas alíquotas de 2mL com auxílio de pipetas estéreis. As amostras foram centrifugadas a 2000 g durante 5 minutos, sendo o sobrenadante destinado para dosagens de açúcares e produtos, após de filtração em membrana de celulose com

uma porosidade de 0,22 μm . O sedimentado foi lavado duas vezes com água destilada e novamente centrifugado, nas mesmas condições descritas anteriormente, para promover a desfloculação das células e retirar qualquer componente do meio que interferisse na quantificação de massa celular. Em todos os procedimentos de amostragem foi observado o máximo rigor asséptico. Na Figura 4.4 encontra-se esquematizada a metodologia utilizada para o processamento das amostras.

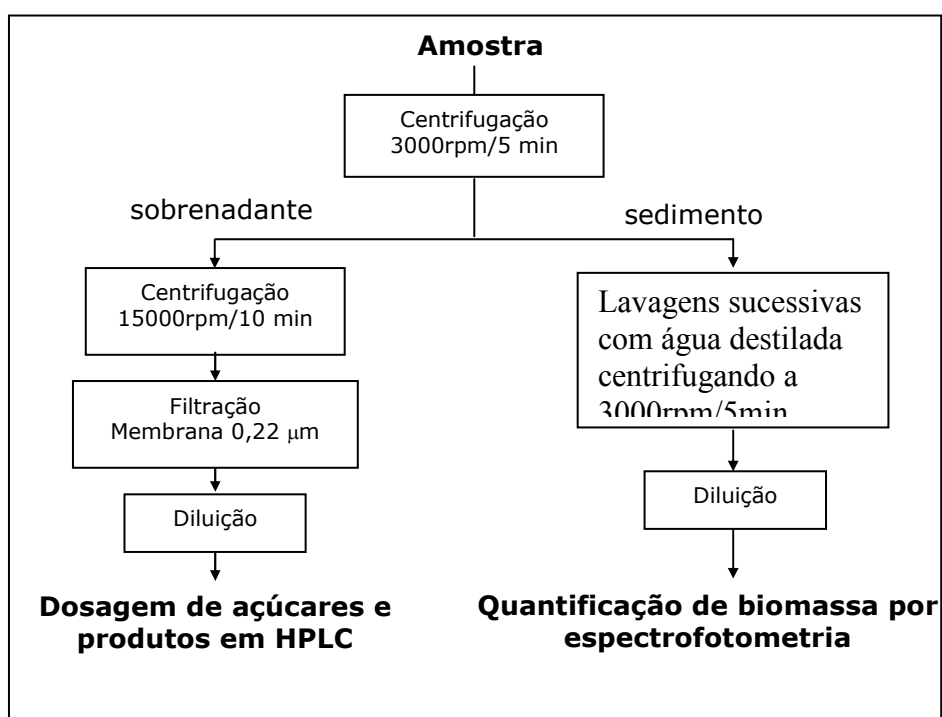


Figura 4.4. Diagrama para o processamento das amostras. Adaptado de BETANCUR (2008).

4.7. Métodos Analíticos

4.7.1. Determinação da Massa Celular

A quantificação celular foi realizada por correlação de massa seca e absorvância a 570 nm para *P.stipitis* (LEAL,1998). Para tal, foi construída previamente uma curva padrão que relacionava a massa seca das células

com a absorvância (Figuras 4.5 e 4.6). As células utilizadas na construção da curva padrão foram cultivadas em frascos cônicos de 500mL contendo 200mL de meio de ativação, a 30°C em agitador rotatório a 250 rpm. Após 48 horas de incubação, as células foram coletadas, lavadas e ressuspensas em água destilada, de modo a obter uma suspensão concentrada. A determinação da concentração das células foi realizada filtrando 20 mL da suspensão, procedimento desenvolvido em triplicata, realizando pesagem das membranas até obtenção de peso constante das amostras durante secagem a 80°C.

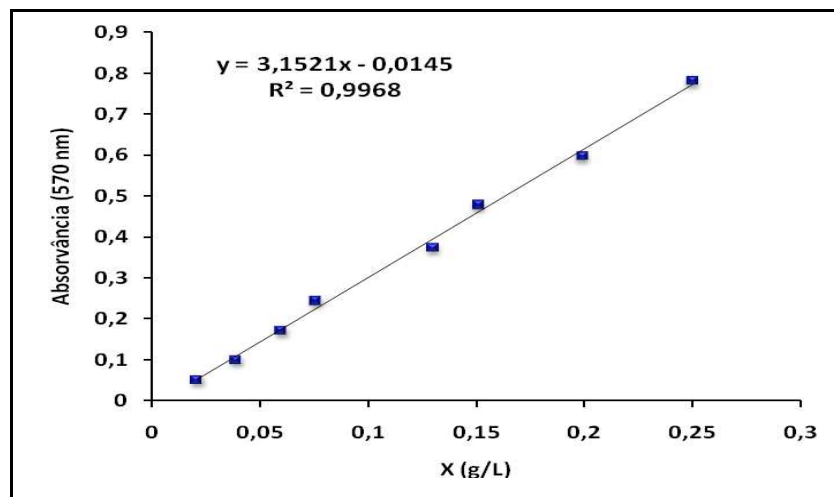


Figura 4.5. Curva de calibração para estipe LADEBIO 01.

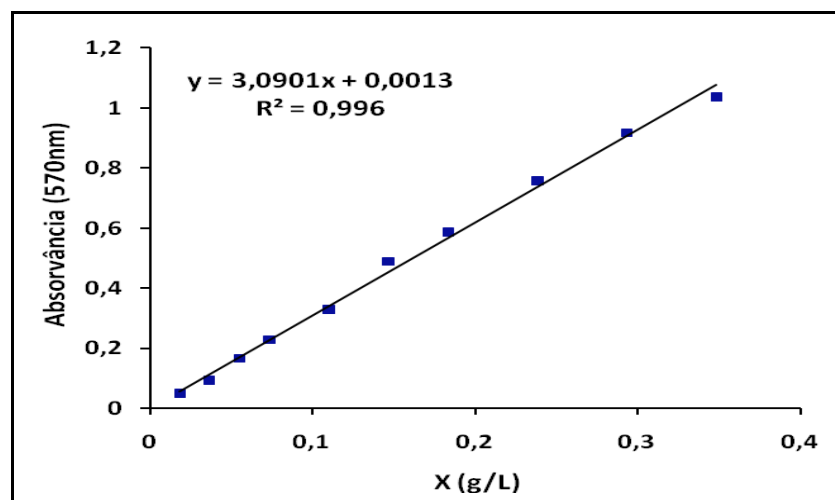


Figura 4.6. Curva de calibração para estipe CBS5774.

4.7.2. Determinações Quantitativas

As concentrações de xilose e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo 'Waters' (Sistema de bombeamento modelo 510, injetor Rheodyne, detector de diferencial de índice de refração -DIR- modelo 410), acoplado a uma coluna de troca catiônica Aminex HPX-87P, fabricada pela Bio-Rad. As condições operacionais utilizadas para as análises encontram-se especificadas na tabela 4.4.

Tabela 4.4. Condições operacionais do cromatógrafo para quantificação de açúcares e metabolitos principais.

Fase móvel:	Água MilliQ desgaseificada
Vazão de fase móvel:	0,6 mL/min
Pressão máxima:	2000 psi
Volume de amostra:	5 µL (amostra)
T _{externa} :	85°C (forno)
T _{interna} :	40°C (detector)

As concentrações das substâncias analisadas nas amostras foram calculadas por comparação com padrões externos de concentração conhecida, com áreas cromatográficas calculadas pelo próprio equipamento. A correlação utilizada para o cálculo das concentrações das amostras foi:

$$\text{Concentração da amostra} = \frac{\text{Área da amostra} \cdot \text{concentração do padrão}}{\text{Área do padrão}} \cdot \text{diluição}$$

Para a realização das análises foram preparadas soluções padrão para Xilose presente no hidrolisado (10 g/L) e de etanol (10 g/L).

4.7.3. Variáveis de Resposta

Os parâmetros próprios de processos de fermentação foram considerados da seguinte forma:

a) Fator de rendimento de produção de etanol (g/g)

$$Y_{P/S} = -(\Delta P / \Delta S) = (P - P_o) / (S_o - S)$$

Tal que:

P: Concentração final de etanol (g/L)
P_o: Concentração inicial de etanol (g/L)
S: Concentração final de substrato (g/L)
S_o: Concentração inicial de substrato (g/L)

b) fator de rendimento para crescimento celular (g/g)

$$Y_{X/S} = -(\Delta X / \Delta S) = (X - X_o) / (S_o - S)$$

Tal que:

X: Concentração final de biomassa (g/L)
X_o: Concentração inicial de biomassa (g/L)
S: Concentração final de substrato (g/L)
S_o: Concentração inicial de substrato (g/L)

c) Produtividade volumétrica (g/L.h)

$$Q_p = (P - P_o) / t_f$$

Tal que:

P: Concentração final de etanol (g/L)
P_o: Concentração inicial de etanol (g/L)
t_f: Tempo de fermentação (h)

4.8. Estudo da Influência dos Inibidores Celulares do Hidrolisado Hemicelulósico no Crescimento Celular e na produção de Etanol para *Picha stipitis* (LADEBIO01 e CBS5774)

Para se avaliar a influência de alguns inibidores celulares (ácido acético, furfural e hidroximetil-furfural) presentes no hidrolisado hemicelulósico, foi realizado um planejamento experimental central composto com 19 experimentos e 5 pontos centrais para cada estirpe de levedura, tanto para crescimento celular quanto para produção de etanol. As variáveis com seus níveis podem ser apreciados na tabela 4.5. A Tabela 4.6 exhibe as concentrações de inibidores adicionadas no meio sintético em cada experimento. Os níveis utilizados neste planejamento visam atender e extrapolar concentrações de inibidores presentes em hidrolisados processados em diferentes condições pelo Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos e Centro de Pesquisa da Petrobrás.

Tabela 4.5 Variáveis e níveis utilizados no estudo de inibição celular.

Variável	- α	-1	0	+1	+ α
Ac.acético (g/L)	1,91	6	12	18	22,09
Furfural (ppm)	95,5	300	600	900	1104,5
HMF (ppm)	31,8	100	200	300	368,2

Tabela 4.6. Concentração dos inibidores adicionados ao meio sintético.

	Furfural (ppm)	HMF (ppm)	Ac. Acético (g/L)
1	300,0	100,0	6,00
2	300,0	100,0	18,00
3	300,0	300,0	6,00
4	300,0	300,0	18,00
5	900,0	100,0	6,00
6	900,0	100,0	18,00
7	900,0	300,0	6,00
8	900,0	300,0	18,00
9	95,5	200,0	12,00
10	1104,5	200,0	12,00
11	600,0	31,8	12,00
12	600,0	368,2	12,00
13	600,0	200,0	1,91
14	600,0	200,0	22,09
15	600,0	200,0	12,00
16	600,0	200,0	12,00
17	600,0	200,0	12,00
18	600,0	200,0	12,00
19	600,0	200,0	12,00

4.8.1. Preparo dos Meios e Adição dos Inibidores

Os experimentos foram realizados em frascos cônicos de vidro de 500mL com volume reacional de 200mL, Foi utilizado o meio descrito na tabela 4.2, entretanto para crescimento celular foi utilizado 20g/L de Xilose e para fermentação 50g/L. Foram então adicionados de diferentes concentrações de inibidores celulares, totalizando 76 experimentos acrescidos de 4 controles positivos, onde não há presença de inibidor algum, visando analisar o comportamento das linhagens de *P.stipitis* na ausência destes inibidores.

Primeiramente foi adicionado o Ácido acético e então ajustado o pH para 6,0, após a autoclavação a 1atm por 15min os frascos foram enumerados de 1 a 20 e adicionados diferentes concentrações de furfural e HMF, com exceção do frasco 20 (controle positivo). O procedimento foi realizado primeiramente para LADEBIO01 e, posteriormente, repetido para CBS5774.

4.8.2. Estudo do Perfil de Crescimento Celular na Presença de Inibidores Celulares

As células foram aclimatadas conforme descrito anteriormente, diluídas e inoculada uma concentração inicial de célula de aproximadamente 0,02g (10mL de inóculo) em cada frasco. Os frascos foram incubados a 30°C, 200rpm durante 48h. A cada 12 horas foi realizada a amostragem de 2ml com auxílio de ponteiras estéreis. Foi realizada a leitura de concentração celular por espectofotometria de massa visando obter a cinética de crescimento das estirpes nas diferentes concentrações de inibidores celulares.

4.8.3. Estudo do Perfil de Produção de Etanol na Presença de Inibidores Celulares

4.8.3.1. Propagação de Células

As células foram aclimatadas assim como no item 4.8.2 entretanto na etapa final de aclimação foi necessário um volume reacional consideravelmente maior para atingir uma concentração de células de 5g/L em cada frasco, concentração de célula esta utilizada em todas as fermentações realizadas neste estudo.

4.8.3.2. Fermentação

A fermentação foi realizada nas mesmas condições do item 4.8.2, exceto pela concentração inicial de células que agora foi de 5g/L e a concentração de xilose sendo neste momento de 50g/L. A cada 12 horas foram amostradas alíquotas de 1mL, centrifugadas a 2000 g por 3 minutos e o sobrenadante diluído e o a concentração de etanol analisada através de HPLC (conforme previamente prescrito).

4.9. Caracterização Molecular das Linhagens de *Pichia stipitis*

4.9.1. Extração de DNA de Leveduras

As linhagens foram crescidas em 50mL de meio sintético adicionado de 50% de hidrolisado hemicelulósico à 30° C por 24h sob agitação de 200 rpm. Foi retirada uma alíquota de 1,5 ml e adicionados em tubos para microcentrifuga e em seguida centrifugados (5000 g/10min); o precipitado foi ressuspenso e homogeneizado em 500µL de tampão de extração (0,15 M NaCl, 50mM tris-HCL, 10mM EDTA, 2% de SDS [pH 8.0]) sendo incubado a 65° por 1 h. Foram adicionados 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado cuidadosamente e centrifugado a 10.000 rpm/15 min/5°C); o sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 50 µL de etanol 70% frio e centrifugado a 10000 g/10 min; o etanol foi descartado e os tubos colocados para secar sobre papel toalha. Após a completa evaporação dos resíduos do etanol, o DNA foi ressuspenso em 50 µL de TE (100 mM Tris-HCL [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) e estocado à -4° C. A qualidade e quantidade do DNA obtidas foram analisadas após eletroforese em gel de agarose 1% (90v/30min), sendo corados com brometo de etídio, visualizados em luz UV e fotografados (VALENTE 1996, Modificado de VILGAYS & HESTER,1990).

4.9.2. Amplificação Via PCR da Região D1/D2 do 26S rDNA

As regiões D1/D2 das linhagens foram amplificadas por PCR, utilizando-se iniciadores NL1 (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') e NL4 (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3') (KUTZMAN & ROBNETT,1998). Foi utilizada a seguinte mistura de reação (kit Gibco BRL): 38µL de água milli-Q esterilizada; 5,0 µL de tampão de amplificação 10 concentrado com MgCl₂ (concentração final 1,5mM); 2,5µL de MgCl₂; 1,0µL de dNTP 10mM; 0,5µL de Taq DNA polimerase (2,5 U); 1,0µL de

cada iniciador: NL1 e NL4 (concentração inicial de 20 pmol/ μ L); 1 μ L do DNA alvo (100 a 200ng). O programa de ciclagem utilizado foi: uma desnaturação inicial 1 ciclo de 94°C/3min, 52°C/30 segundos e 72°C/30 segundos; 35 ciclos de 94°C/1 min, 52°C/30 segundos e 72°C/30 segundos; com uma extensão final de 72°C/10min. Os produtos de PCR foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1% (90v/30 min), utilizando padrão de corrida 100pb (Invitrogen ®), sendo então corados com brometo de etídio, visualizados em luz UV e fotografados.

4.9.3. Amplificação Via PCR da Região espaçadora intergênica (ITS)

A região ITS do rDNA das leveduras selecionadas for amplificada com os iniciadores universais ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS2 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') de acordo com WHITE *et al.* (1990) (apud, VALENTE, *et al.*, 1997). Foi utilizada a seguinte mistura de reação (kit Invitrogen): 38,0 μ L de água milli-Q esterilizada; 5,0 μ L de tampão de amplificação 10 X concentrado com MgCl₂ (concentração final 1,5mM); 2,5 μ L de MgCl₂; 1,0 μ L de dNTP 10mM; 0,5 μ L de Taq DNA polimerase (2,5 U); 1,0 μ L de cada iniciador: ITS1 e ITS4 (concentração inicial de 20 pmol/ μ L); 1 μ L do DNA alvo (100 a 200ng). O programa de ciclagem utilizado foi: uma desnaturação inicial 1 ciclo de 94°C/3min; 35 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/30 segundos e 72°C/30 segundos; com uma extensão final de 72°C/10min. Os produtos de PCR foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1% (90v/30 min), utilizando padrão de corrida 100pb (Invitrogen®), sendo então corados com brometo de etídio, visualizados em luz UV e fotografados.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Concentração de Inibidores Celulares Presentes nos Hidrolisados Obtidos em Diferentes Condições de Pré-Tratamento

Com intuito de estabelecer as concentrações dos níveis das variáveis independentes do planejamento experimental realizado, a Tabela 5.1. exibe os valores dos principais inibidores celulares (ácido acético, furfural e hidroximetil-furfural) presentes nos hidrolisados quantificados por HPLC antes e após a autoclavação, uma vez que para o processo de melhoramento da linhagem LADEBIO01 foi estabelecida a utilização de hidrolisado estéril. Os hidrolisados 1 e 3 foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos, enquanto o hidrolisado 5 foi cedido pelo Centro de Pesquisa da Petrobras (CENPES). Os hidrolisados 2 e 4 são, respectivamente os hidrolisados 1 e 3 que foram submetidos ao processo de esterilização por meio de autoclavação. É possível observar que as condições submetidas à esterilização apresentam maiores concentrações de inibidores celulares, justamente por terem sido expostas novamente ao tratamento térmico. O hidrolisado 2 foi o estabelecido para

os experimentos de melhoramento da linhagem LADEBIO 01 através dos repiques sucessivos com concentrações gradativamente maiores de hidrolisado.

Tabela 5.1. Concentração dos inibidores celulares.

Amostra	Condições de Hidrolise				Ácido Acético (g/L)	HMF (mg/L)	Furfural (mg/L)
	Ácido (%)	Relação S:L	Tempo de Hidrolise (min)	Re-autoclavado			
1	1,09	1:2,8	27	não	9,08	78	561
2 ^a	1,09	1:2,8	27	sim	10,35	120	703
3	1	1:2	40	não	16,65	87	610
4	1	1:2	40	sim	17,14	126	930
5 ^b	-	-	-	não	10,55	351	446

a - Hidrolisado adotado para os experimentos de seleção e melhoramento da linhagem LADEBIO01.

b - Hidrolisado cedido pelo CENPES (Centro de Pesquisa da Petrobrás), condições de hidrólise sigilosas.

5.2. Avaliação da Aclimação da Linhagem *Pichia stipitis* LADEBIO01

5.2.1. Avaliação das Concentrações Celulares Cultivada em Concentrações Crescentes de Hidrolisado

Visando avaliar e explorar a capacidade adaptativa da levedura LADEBIO 01 para crescimento celular em meio contendo exclusivamente hidrolisado em concentrações crescentes, conforme ilustrado na Tabela 5.2, a concentração celular foi quantificada ao final de 48h de crescimento em todo primeiro e último repique de cada diferente concentração de hidrolisado. Cabe ressaltar que, previamente a este processo foi realizada a propagação celular em meio sintético para ativar o metabolismo celular.

Tabela 5.2. Concentração celulares em graus crescentes de hidrolisado hemicelulósico.

Repique	Concentração de Hidrolisado (%)	Concentração Celular (g/L)
1	25%	1,55 +/- 0,12 g/L
10	25%	1,62 +/- 0,14 g/L
11	50%	3,28 +/- 0,14 g/L
20	50%	3,60 +/- 0,19 g/L
30	50%	3,56 +/- 0,09 g/L
31	60%	3,44 +/- 0,12 g/L
35	60%	4,25 +/- 0,11 g/L
36	70%	4,05 +/- 0,12 g/L
40	70%	4,92 +/- 0,17 g/L
41	80%	4,12 +/- 0,11 g/L
45	80%	4,68 +/- 0,08 g/L
46	90%	3,32 +/- 0,24 g/L
50	90%	3,40 +/- 0,18 g/L

Caso não houvesse a presença de inibidores, o esperado seria que a concentração celular aumentasse proporcionalmente ao aumento da concentração de substrato. Entretanto, conforme exibido na Tabela 5.2 pode se verificar que a concentração celular aumentou à medida que a concentração de hidrolisado foi incrementada em até 70%, decaindo para concentrações maiores. Todavia nota-se que cada vez que a levedura foi exposta a uma concentração maior de hidrolisado sua concentração final de células diminui e à medida que, sob efeito da pressão seletiva exercida pelos inibidores durante os repiques sucessivos, a levedura se aclimata a cada uma dessas condições e a concentração final de células aumenta. Após 40 repiques nota-se uma concentração celular em torno de 5g/L na presença de 70% de hidrolisado. Quando a levedura foi submetida apenas a duas aclimações prévias (25% e 50%) e, em seguida, submetida a um cultivo a 70% de hidrolisado a concentração final de células (após 48h de incubação) observada foi menor do que o cultivo realizado a 50%, conforme pode se observar na Tabela 5.3 confirmando assim, de acordo com outros trabalhos, sua capacidade aclimatativa aos inibidores celulares quando em contato prévio com os mesmos (NIGAM, 2001); (BETANCUR, 2005).

Tabela 5.3. Concentração celular em apenas três aclimações em concentrações crescentes de hidrolisado hemicelulósico.

Repique	Concentração de Hidrolisado (%)	Concentração Celular (g/L)
1	25%	1,61 +/- 0,17 g/L
2	50%	3,55 +/- 0,12 g/L
3	70%	2,88 +/- 0,17 g/L

5.2.2. Avaliação dos Perfis de Fermentação em Função de Vários Graus de Aclimação

Com intuito de obter melhorias no processo fermentativo de xilose proveniente do hidrolisado hemicelulósico, no decorrer dos repiques sucessivos da levedura LADEBIO01 ensaios de fermentação foram realizados para avaliar as possíveis melhorias deste bioprocessos, onde as variáveis analisadas foram o consumo de Xilose, a produção de etanol e a produção celular (representada nos gráficos por X). Foram realizadas fermentações da linhagem LADEBIO01 nas seguintes condições:

- Em meio sintético (Figura 5.1);
- Com aclimação em duas etapas (25% e 50%) (Figura 5.3);
- Sem aclimação prévia das células (Figura 5.5);
- Com células aclimatadas durante 10 repiques, porém apenas a 25% de hidrolisado (Figura 5.6);
- Após os 20º, 30º e 40º repiques (Figuras 5.7, 5.8 e 5.9, respectivamente).

Além disso, para efeito comparativo e comprovar a evolução na capacidade de aclimação da linhagem LADEBIO01, foram realizados os ensaios para a linhagem CBS5774, recentemente importada do arquivo CBS, nas seguintes condições:

- Em meio sintético (Figura 5.2);
- Com aclimação em duas etapas (25% e 50%) (Figura 5.4).

Observando-se as Figuras 5.1 e 5.2 nota-se que mesmo em meio sintético a levedura LADEBIO01 apresenta melhor desempenho quando

comparada à CBS 5774 (taxa de consumo xilose de $-2,1\text{g/L.h}$ e $-1,8\text{g/L.h}$, respectivamente) e concentrações finais de etanol superiores ($23,6\text{g/L}$ e $21,2\text{g/L}$, respectivamente).

Quando analisadas as Figuras 5.3 e 5.4, onde ambas as linhagens passaram pelo processo de aclimação em duas etapas (25% e 50% de hidrolisado) previamente a fermentação, nota-se uma diferença ainda maior. A Tabela 5.4 que será exibida mais adiante ilustra os valores dos fatores de rendimento em produto ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica de etanol (Q_P).

Ensaio moleculares ainda não concluídos com estas duas linhagens de leveduras pela Universidade de Brasília em parceria com o Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos sugerem uma possível diferença nos transportadores de xilose, entretanto mais estudos são requeridos. Todavia, as cinéticas das fermentações realizadas no presente estudo contemplam fortemente esses indícios.

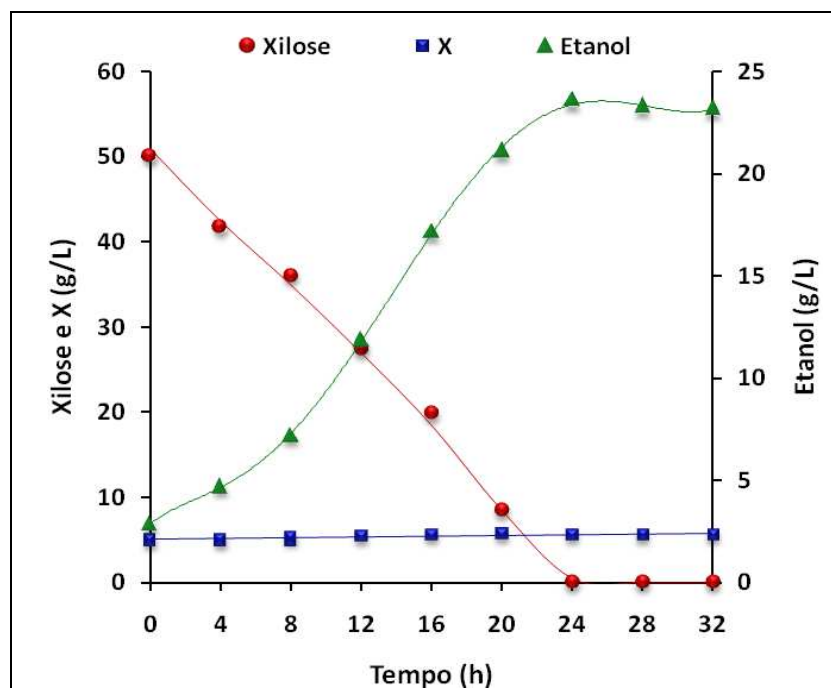


Figura 5.1. Cinética de fermentação em meio sintético por LADEBIO 01.

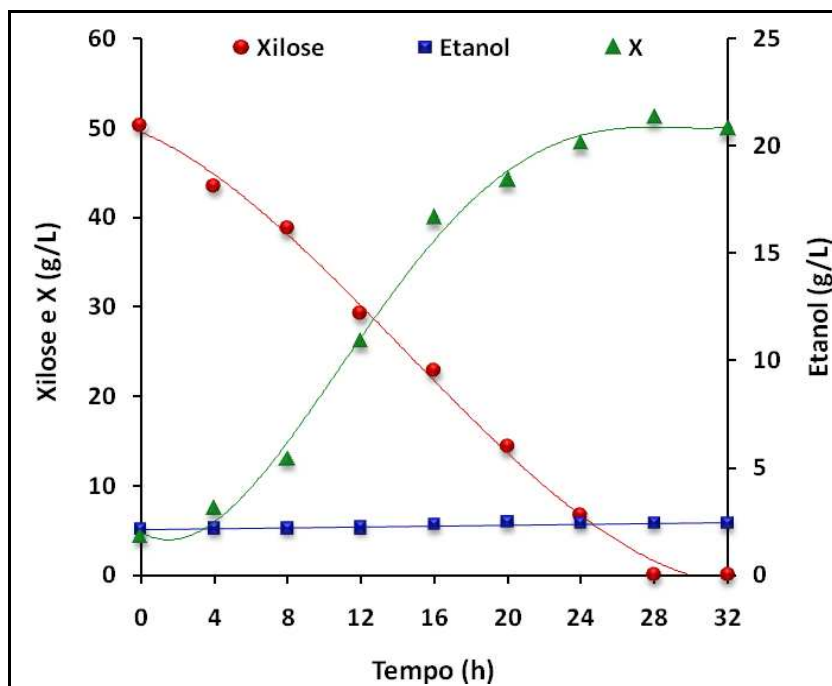


Figura 5.2. Cinética de fermentação em meio sintético por CBS5774.

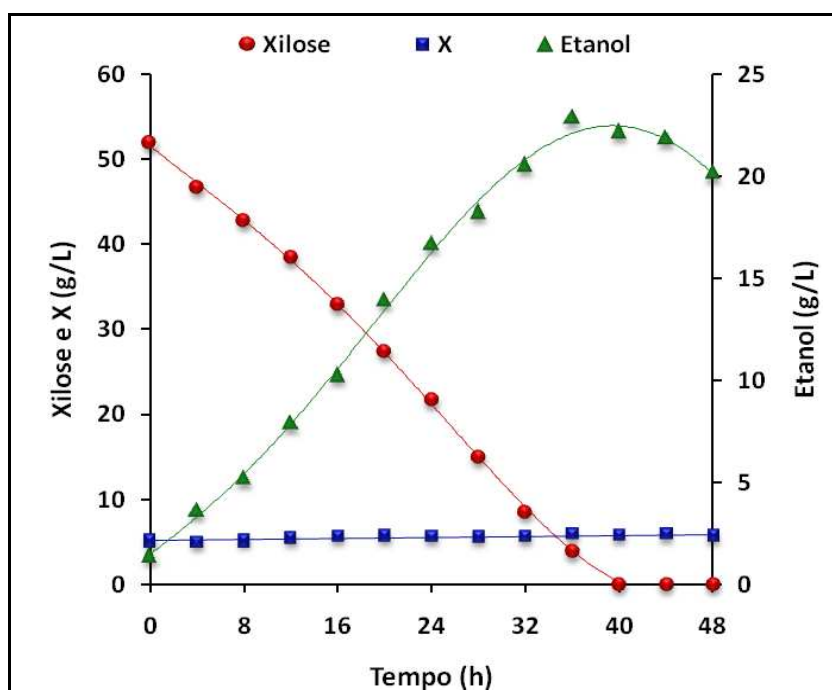


Figura 5.3. Cinética de fermentação em hidrolisado com aclimação prévia em 2 etapas (25% e 50% de hidrolisado) por LADEBIO 01.

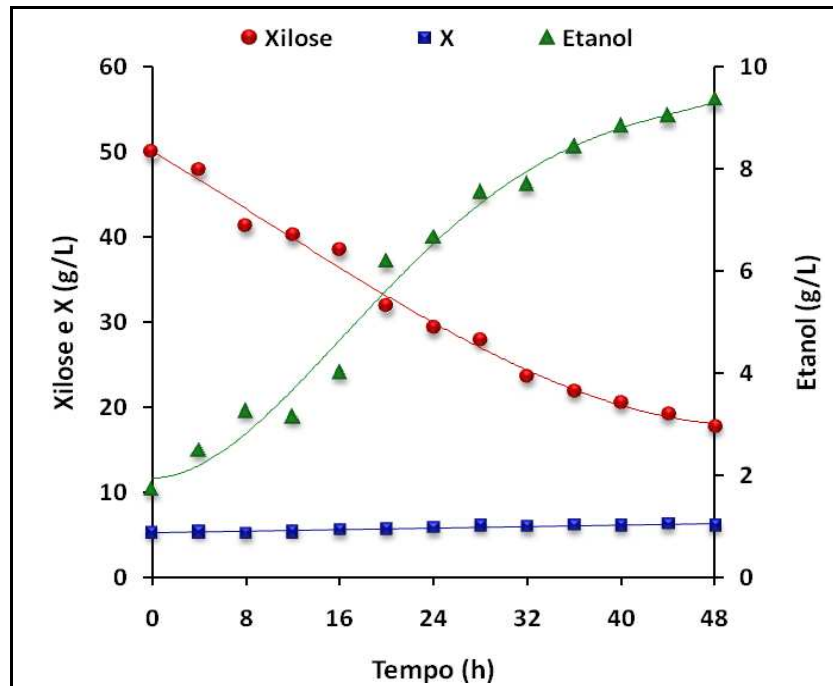


Figura 5.4. Cinética de fermentação em hidrolisado com aclimação prévia em 2 etapas (25% e 50% de hidrolisado) por CBS 5774.

A seguir, as cinéticas de fermentações apresentadas referem-se exclusivamente a levedura LADEBIO01, no intuito de explorar ainda mais a capacidade aclimatativaa previamente exibida por esta linhagem.

As Figuras 5.5 e 5.6 ilustram, de acordo com trabalho realizado por BETANCUR (2005), a necessidade da aclimação prévia para a realização de uma fermentação eficiente. No caso da Figura 5.5 as células foram propagadas em meio sintético e, em seguida, submetidas à fermentação, enquanto na Figura 5.6 as células após o cultivo de ativação em meio sintético foram propagadas repetidamente por 10 passagens em meio contendo hidrolisado a 25%, sendo então, inoculadas em reator para o processo fermentativo. Nesta cinética, conclui-se que apenas o tempo de exposição ao hidrolisado (10 repiques de 48h cada) não seria o suficiente para atingir rendimentos similares aos reportados quando a levedura passa pela segunda fase de adaptação em 50% de hidrolisado.

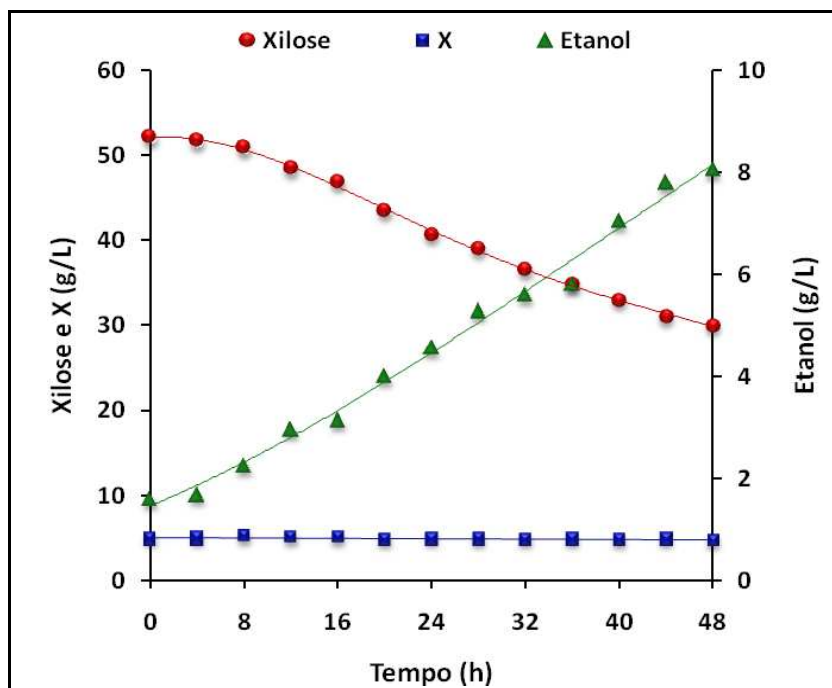


Figura 5.5. Cinética de fermentação em hidrolisado Com células propagadas em meio sintético (sem aclimação) por LADEBIO01.

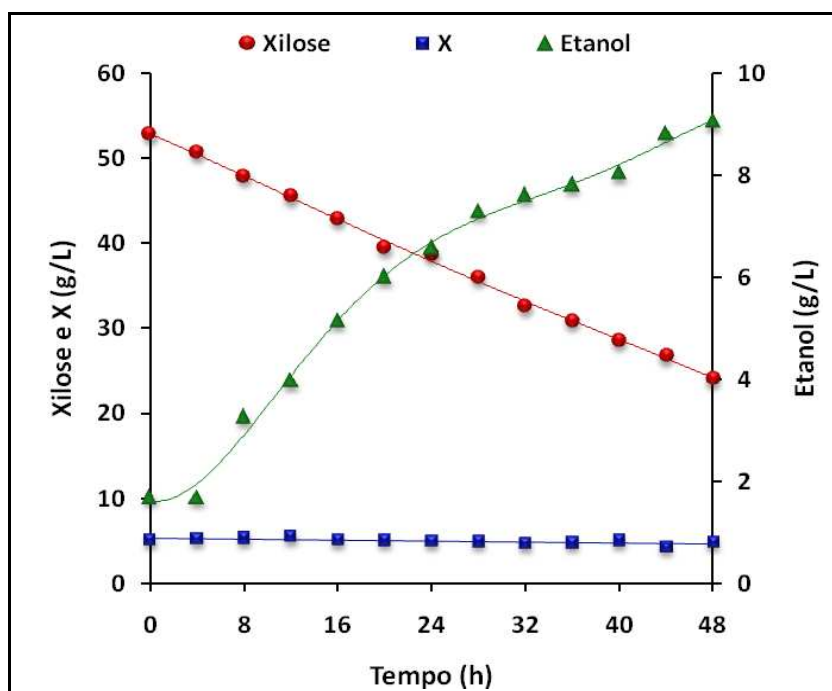


Figura 5.6. Cinética de fermentação em hidrolisado após o 10º repique (células crescidas e propagadas em 25% de hidrolisado) por LADEBIO01.

As Figuras 5.7, 5.8 e 5.9 referem-se às fermentações realizadas após o 20º, 30º e 40º repiques, respectivamente. Para as figuras 5.7 e 5.8 os ensaios realizados tiveram as células cultivadas em 50% de hidrolisado, exibindo perfis muito semelhantes em suas cinéticas, com um ligeiro aumento na taxa de consumo de substrato e no fator de rendimento da produção de etanol ($Y_{P/S}$). Entretanto, a figura 5.9 representa o experimento no qual as células foram cultivadas por cinco repiques sucessivos em 60% e, posteriormente, mais cinco em 70% de hidrolisado. Somente após este processo, as células foram submetidas à fermentação alcoólica. Pode-se observar que, neste ensaio, a fonte de carbono esgota-se em 32h, tempo inferior aos demais ensaios. Além disto, esta condição experimental possui os melhores resultados de taxa de consumo de substrato, fator de rendimento da produção de etanol (0,47 g/g) e produtividade volumétrica em etanol (0,84 g/L.h) (Tabela 5.4).

Apesar de não ser reportado na literatura para *P.stipitis*, observa-se em todos os ensaios que existe uma diminuição da concentração de etanol após o esgotamento da fonte de carbono. Caso tivesse ocorrido em apenas um ou poucos ensaios poderia se sugerir um possível erro analítico, entretanto não foi o observado, indicando uma provável utilização do etanol como fonte de carbono para manutenção das células. Este fato é relatado em alguns trabalhos para *P.pastoris* e *S.cerevisiae* (FERREIRA, 2005).

Cabe ressaltar que em todos os ensaios fermentativos houve um baixo aumento na concentração celular (representado por X) (Tabela 5.4). Além disso, para a linhagem LADEBIO01, os ensaios nos quais as células foram aclimatadas pelo menos em duas etapas (25% e 50% de hidrolisado) atingem uma concentração de etanol próxima da máxima teórica (0,51g etanol/g Xilose). Este mesmo fenômeno ocorre para fermentação em meio sintético para a linhagem CBS5774. Esses resultados confirmam a adequação da levedura *Pichia stipitis* para

produção de etanol a partir de xilose como fonte de carbono. Em especial a linhagem *Pichia stipitis* LADEBIO01, após o processo de aclimação (Figura 5.9) que atinge concentrações próximas ao máximo teórico mesmo na presença dos inibidores celulares (Ver Figura 5.9 e Tabela 5.3), confirmando o melhora no processo fermentativo da linhagem quando as células foram submetidas à aclimações sucessivas em concentrações gradativamente maiores de hidrolisado hemicelulósico.

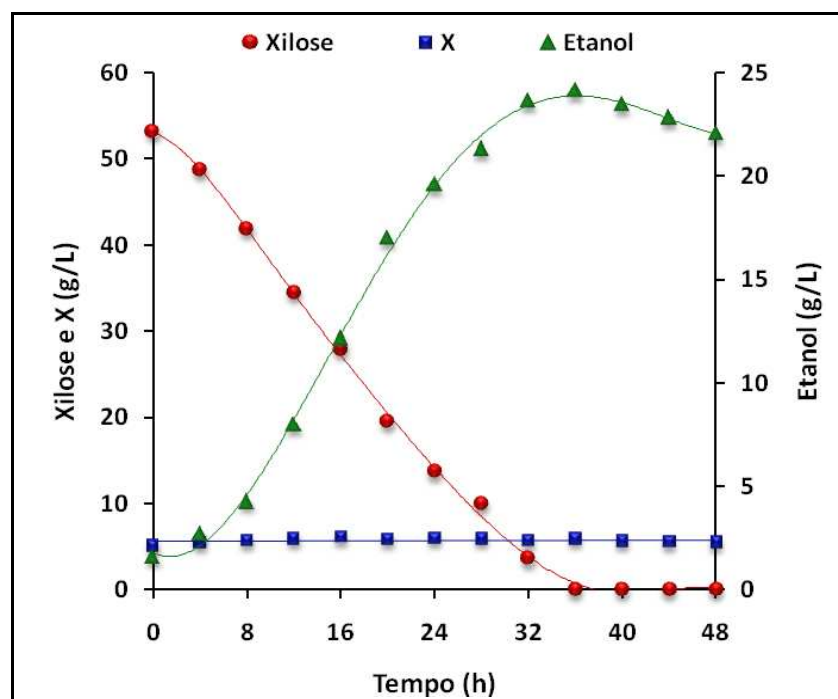


Figura 5.7. Cinética de fermentação em hidrolisado após o 20º repique sucessivo (após o 10º repique as células foram submetidas à cultivos contendo 50% de hidrolisado)por LADEBIO01.

Para facilitar à visualização e comparação dos processos fermentativos, as figuras 5.10 e 5.11 exibem os perfis de consumo de xilose e de produção de etanol, respectivamente.

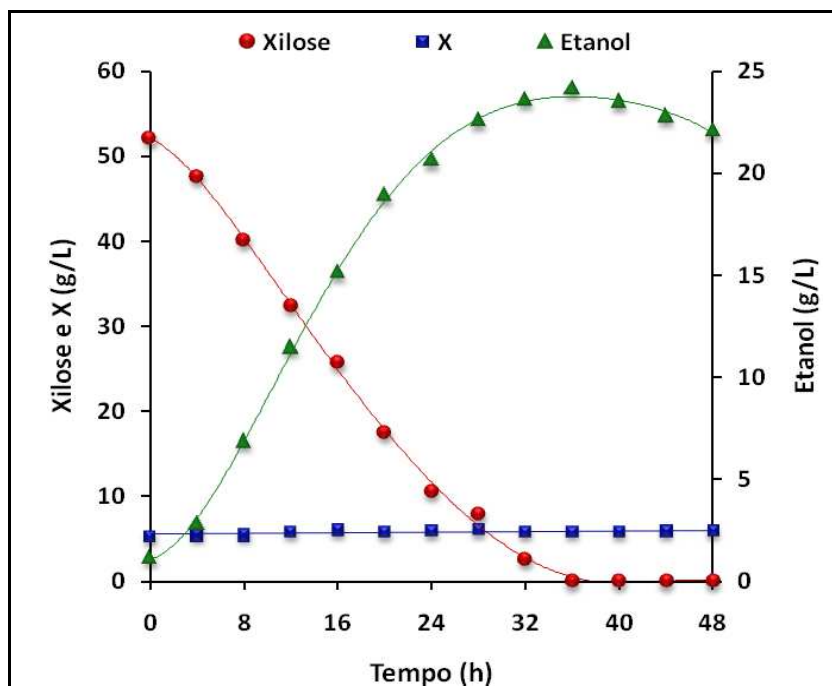


Figura 5.8. Cinética de fermentação em hidrolisado após o 30º repique sucessivo por LADEBIO01.

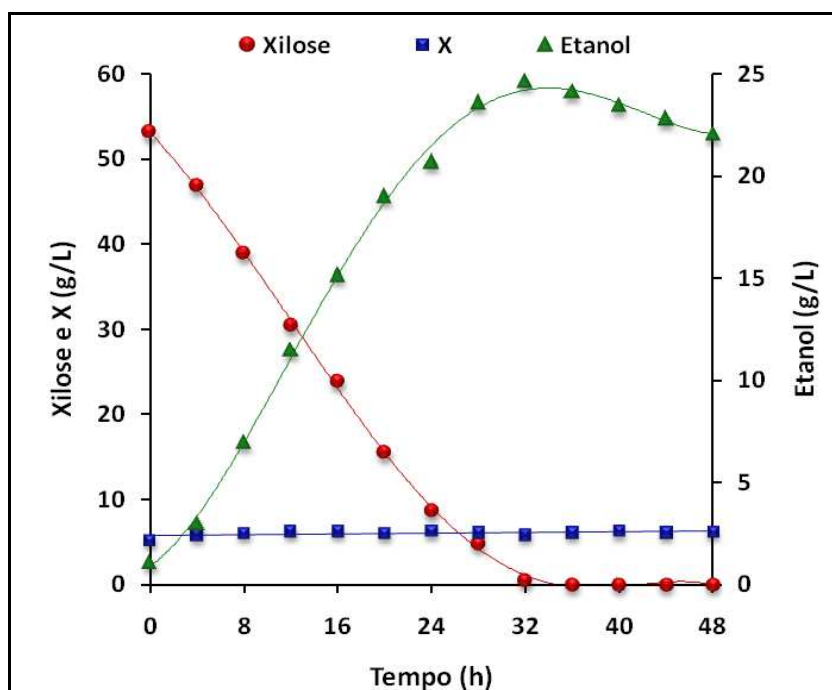


Figura 5.9. Cinética de fermentação em hidrolisado após o 40º repique sucessivo (após o 30º repique foi utilizado 60% de hidrolisado durante 5 passagens e posteriormente 70% nos 5 repiques seguintes) por LADEBIO01.

Pode-se observar na Figura 5.10 que mesmo em meio sintético, no qual há ausência de inibidores celulares, a linhagem LADEBIO01 possui uma maior eficiência no consumo da xilose quando comparada com a linhagem CBS5774. Além disso, pode se observar que esta segunda linhagem, mesmo após a aclimação em duas etapas (25% e 50%) não esgota fonte de carbono após 48h horas de fermentação, sendo quantificado ainda após este período cerca de 20g/L de xilose, indicando novamente uma maior suscetibilidade desta linhagem recentemente importada aos inibidores celulares em questão. Este perfil cinético da linhagem CBS5774 mostra-se superior apenas a LADEBIO01 em condições onde esta foi propagada apenas em meio sintético ou em 25% de hidrolizado, sendo mais um indicativo da necessidade de aclimação celular previa, conforme já demonstrada por BETANCUR (2005). Contudo, o consumo de substrato pelas células aclimatadas sucessivamente até o teor de 70% de hidrolizado possui um perfil muito próximo daquele em meio sintético para a linhagem CBS5774 indicando a aquisição de robustez celular após as aclimações sucessivas. Para a produção de etanol (Figura 5.11), a linhagem CBS5774 mesmo após as duas etapas de aclimação apresenta um Q_p de apenas 0,19 g/L.h; P de 9,36 g/L, valores praticamente iguais aos apresentados pela linhagem LADEBIO01 não aclimatada (Q_p de 0,17 g/L.h e P de 8,04 g/L), além de exibir um $Y_{P/S}$ de apenas 0,24 g/g, sendo inferior ao da linhagem LADEBIO01 não aclimatada ($Y_{P/S}$ de 0,29 g/g)(tabela 5.4), indicando uma maior robustez da linhagem LADEBIO01 mesmo antes do processo de aclimação quando comparada com a linhagem CBS5774. Após o 40º repique esta linhagem alvo de estudo apresenta uma cinética melhor inclusive do que aquele obtido em meio sintético pela linhagem CBS5774 tanto para produtividade volumétrica em etanol (Q_p de 0,84 g/L.h e 0,76 g/L.h, respectivamente), quanto para fator de rendimento de produção de etanol ($Y_{P/S}$ de 0,47 g/g e 0,39 g/g) e concentração final de etanol (P de 24,62 g/L e 21,27 g/L). Esta maior concentração final de etanol partindo de aproximadamente

concentrações iguais de substrato pela linhagem LADEBIO01 quando comparada com a CBS5774 evidencia uma maior eficiência na conversão de xilose à etanol, enquanto esta segunda linhagem provavelmente utiliza um teor maior deste substrato para manutenção celular. Este conjunto de dados evidencia o sucesso da utilização da linhagem LADEBIO01 para a bioconversão de xilose proveniente do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana não destoxificado em etanol, sobretudo após a pressão seletiva (aclimações) pela qual a linhagem em questão foi submetida.

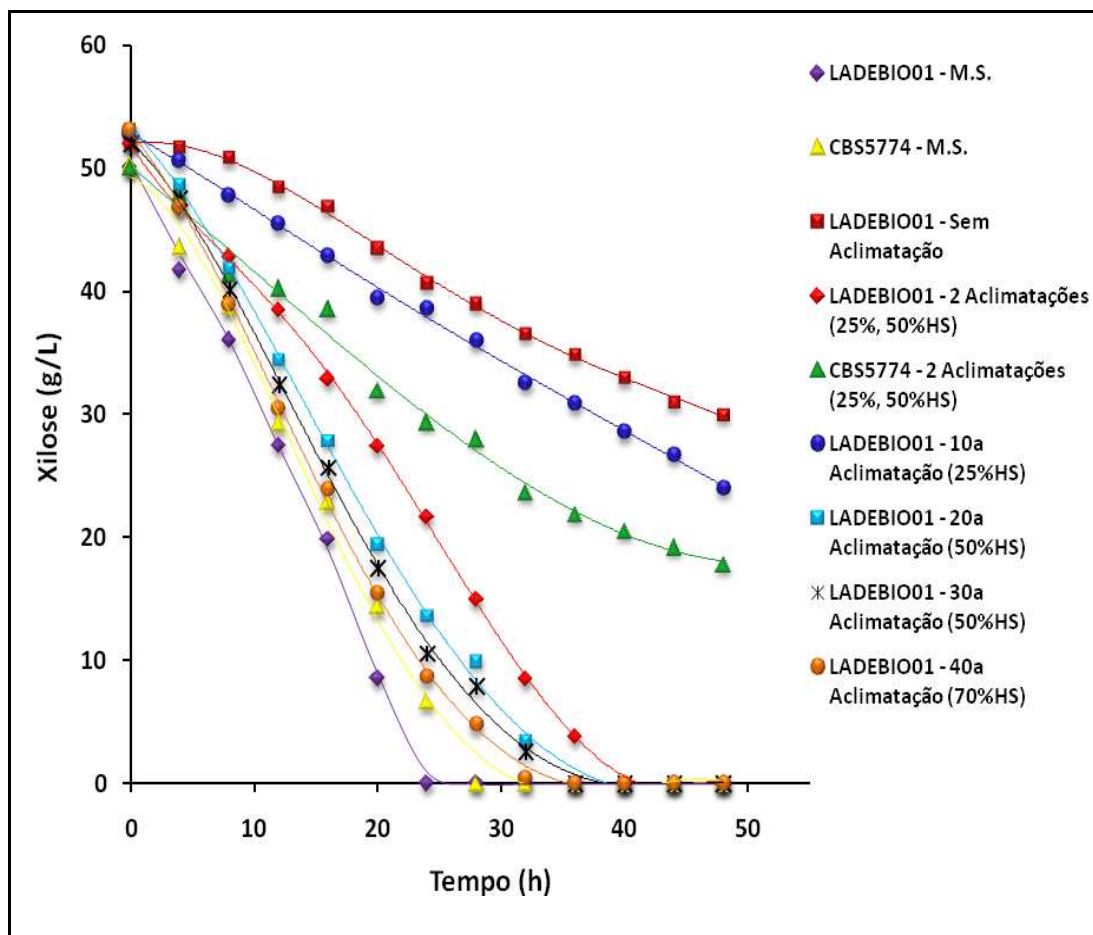


Figura 5.10. Perfil de consumo de substrato em fermentações de meio sintético e hidrolisado utilizando células em diferentes condições de propagação.
M.S – Meio Sintético; HS – Hidrolisado.

De acordo com BETANCUR (2005) a levedura *Pichia stipitis* atinge valores de Q_p de 0,85 g/L.h para fermentações em meio sintético e 0,77g/L.h para fermentações em hidrolisado quando aclimatada em 2 etapas. A mesma, quando submetida a processos de aclimação mostrou uma produtividade maior para meio sintético e um pouco inferior quando aclimatada, entretanto exibiu após o 40º repique uma produtividade volumétrica de etanol (0,84 g/L.h) praticamente igual ao encontrado por este autor para meio sintético, mostrando a alta capacidade adaptativa da linhagem utilizada no presente trabalho aos inibidores celulares.

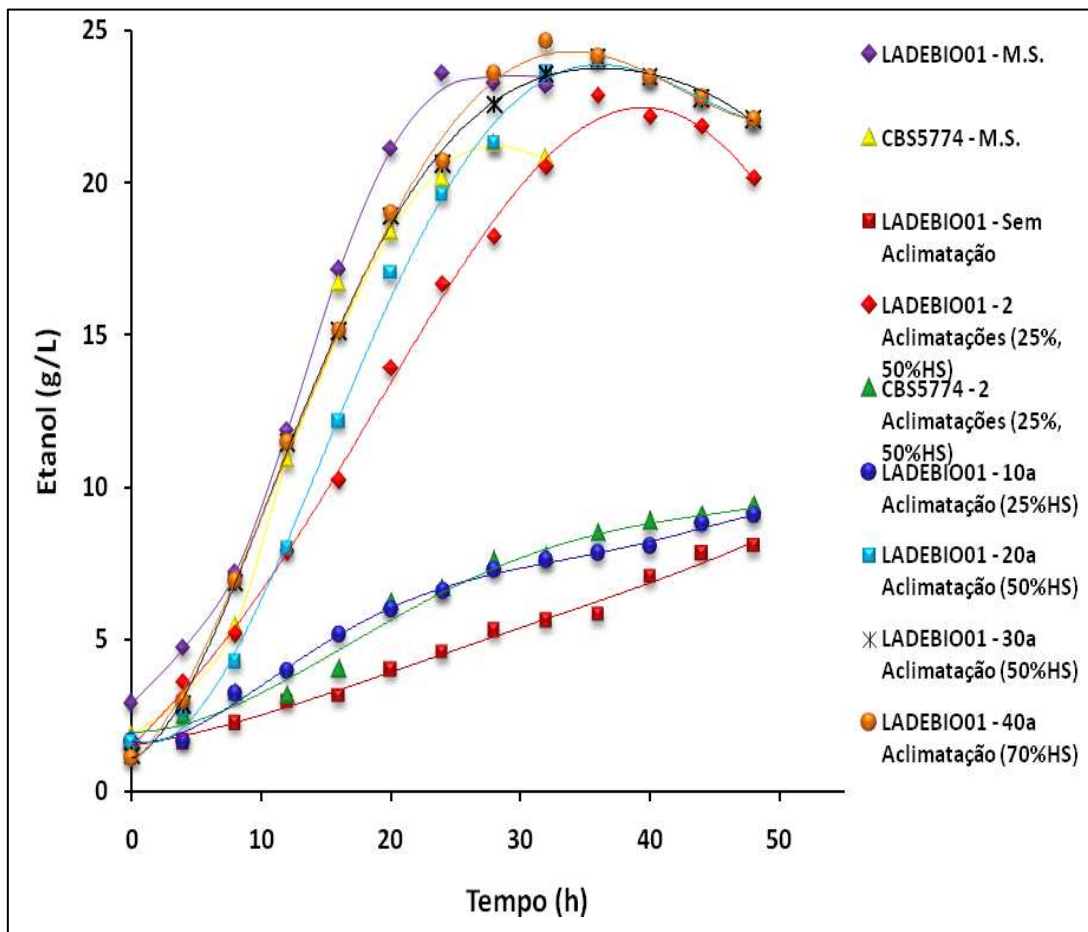


Figura 5.11. Perfil de produção de etanol em fermentações de meio sintético e hidrolisado utilizando células em diferentes condições de propagação.
M.S – Meio Sintético; HS – Hidrolisado.

Tabela 5.4. Valores mais relevantes dos processos fermentativos.

Tipo de Fermentação	t_f (h)	Q_P (g/L.h)	P (g/L)	Y_{X/S} (g/g)	Y_{P/S} (g/g)
Meio Sintético (LADEBIO01)	24	0,98	23,56	0,02	0,41
Meio Sintético (CBS5774)	28	0,76	21,27	0,04	0,39
Sem Aclimação (LADEBIO01)	48	0,17	8,04	0,02	0,29
#10 (LADEBIO01)	48	0,19	9,04	0,02	0,26
Com Aclimação (LADEBIO01)	40	0,71	22,82	0,03	0,45
Com Aclimação (CBS5774)	48	0,19	9,36	0,05	0,24
#20 (LADEBIO01)	36	0,74	24,10	0,03	0,44
#30 (LADEBIO01)	36	0,75	24,20	0,03	0,45
#40 (LADEBIO01)	32	0,84	24,62	0,03	0,47

5.3. Ensaio de Tolerância aos Inibidores Celulares para Crescimento Celular e Fermentação por LADEBIO01 e CBS5774

É conhecida a presença de inibidores celulares em hidrolisado hemicelulósico obtido através do pré-tratamento ácido de materiais lignocelulósicos, dentre os principais: ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (PARAJÓ,1998). Assim como conhecido também, conforme descrito no item 2.6.2, seus efeitos no metabolismo celular, nos quais destacam-se a redução do crescimento celular, da formação de ATP e produção de etanol (GUTIÉRREZ et al.,2002). Estes inibidores podem causar inclusive a morte celular ao interferir com a respiração e a fosforilação oxidativa (PARAJÓ, 1998). Além disso, acarretam na diminuição do pH intracelular gerando problemas no transporte de diversos nutrientes, no caso do ácido acético. Todavia até o presente momento não há relatos na literatura das concentrações toleráveis para *Pichia stipitis* para o crescimento celular, tampouco para a fermentação alcoólica. Sendo assim, o planejamento central composto realizado exibe não só estes limites, como a hierarquia de interferência destes inibidores e, por último, nos permite comparar o desempenho metabólico das duas linhagens na presença destes inibidores, sendo mais uma ferramenta para exibir e comprovar as diferenças no comportamento metabólico entre as linhagens LADEBIO01 e CBS5774.

5.3.1. Crescimento Celular

As tabelas 5.5 e 5.6 exibem as concentrações celulares obtidas em cada experimento para a linhagem LADEBIO01 e CBS5774, respectivamente. Cabe ressaltar que as células foram aclimatadas a 25% e 50% (v/v) de hidrolisado previamente.

Tabela 5.5. Concentrações celulares da linhagem LADEBIO01 obtidas em meio sintético na presença de diferentes concentrações pré-estabelecidas de inibidores celulares.

Ensaio	Concentração celular (g/L)			
	Tempo			
	12h	24h	36h	48h
1	0,438	1,954	4,092	4,59
2	0,091	1,238	2,604	3,514
3	0,36	1,789	3,927	4,258
4	0,067	0,472	2,423	3,679
5	0,028	0,083	0,488	2,356
6	0,018	0,023	0,025	0,08
7	0,031	0,036	0,157	1,695
8	0,001	0,017	0,025	0,041
9	0,637	1,717	3,287	4,076
10	0,024	0,036	0,041	0,09
11	0,107	0,644	2,241	3,117
12	0,025	0,063	1,53	2,902
13	0,057	1,081	1,711	4,208
14	0,001	0,042	0,041	0,306
15 c	0,025	0,115	1,612	2,902
16 c	0,028	0,103	1,695	3,018
17 c	0,025	0,109	1,724	2,935
18 c	0,031	0,103	1,581	2,886
19 c	0,028	0,11	1,622	2,968
C+	1,166	2,629	3,679	4,456

c: Pontos Centrais.

C+ : Controle positivo, isto é, meio sintético sem inibidores celulares.

Além das 14 diferentes condições estabelecidas pelo planejamento experimental, foram realizados 5 pontos centrais (totalizando 19 experimentos) foram realizados ainda os controles positivos (C+), não havendo inibidor algum, servindo como parâmetro de condição ideal para o metabolismo celular. Desta forma, quanto mais próximo os valores de

concentração celular dos ensaios estiverem do C+, melhor o desempenho de crescimento celular nestas mesmas condições.

Tabela 5.6. Concentrações celulares da linhagem CBS5774 obtidas em meio sintético na presença de diferentes concentrações pré-estabelecidas de inibidores celulares.

Ensaio	Concentração celular (g/L)			
	Tempo			
	12h	24h	36h	48h
1	0,21	1,669	3,976	4,851
2	0,001	0,375	1,687	3,101
3	0,107	1,645	3,208	4,506
4	0,041	0,580	1,753	2,853
5	0,015	0,190	1,594	3,101
6	0,009	0,002	0,007	0,008
7	0,034	0,567	1,158	2,505
8	0,001	0,002	0,007	0,008
9	0,147	1,381	2,547	3,514
10	0,001	0,025	0,046	0,008
11	0,005	0,124	0,919	1,116
12	0,001	0,088	0,575	0,719
13	0,101	1,976	3,856	4,176
14	0,001	0,002	0,023	0,041
15 c	0,001	0,055	0,615	1,844
16 c	0,001	0,061	0,668	1,761
17 c	0,001	0,058	0,562	1,794
18 c	0,001	0,061	0,602	1,745
19 c	0,001	0,061	0,623	1,710
C+	0,981	2,534	3,737	4,672

c: Pontos Centrais.

C+ : Controle positivo, isto é, meio sintético sem inibidores celulares.

Comparando as Tabelas 5.5 e 5.6 é possível verificar que mesmo nas condições em que as duas linhagens tiveram uma concentração celular final semelhantes, a fase Lag da linhagem CBS5774 foi maior, principalmente para os pontos centrais (12 g/L de ácido acético, 600 mg/L de furfural e 200 mg/L de HMF), uma vez que nas primeiras 12h praticamente não houve crescimento celular algum para esta linhagem

nesta condição, sugerindo uma maior dificuldade de assimilar a xilose na presença dos componentes inibitórios.

Enquanto para linhagem LADEBIO01 pode se observar uma concentração celular final de pelo menos 3 g/L (aproximadamente) em 13 ensaios com diferentes concentrações de inibidores celulares, enquanto isso, para linhagem CBS 5774 esta concentração celular ao término das 48h foi atingida apenas em 7 ensaios.

Finalmente, mesmo após as 48h de incubação, as concentrações celulares nos pontos centrais foram bem menores para a linhagem CBS5774 quando comparadas com a linhagem LADEBIO01, enquanto no caso do controle positivo em todos os tempos analisados ambas as linhagens apresentam concentrações celulares similares. Sendo assim, novamente observa-se uma dificuldade metabólica maior para assimilar a xilose na presença dos inibidores celulares pela linhagem CBS5774 quando comparada com a linhagem LADEBIO01.

As Figuras 5.12 e 5.13 exibem os gráficos de Pareto para as linhagens CBS5774 e LADEBIO01, respectivamente nos tempos de 12h e 48h.

Para a linhagem CBS5774 as únicas condições nas quais as concentrações celulares aproximaram-se do controle positivo foram as condições 1 e 3, seguidas da condição 13. Nas duas primeiras condições citadas tanto o ácido acético quanto o furfural encontram-se nas condições -1 do planejamento experimental (6 g/L e 300 mg/L, respectivamente). No ensaio 13, tanto o furfural quanto o HMF encontram-se na condição 0 (ponto central) do planejamento (600 mg/L e 200 mg/L, respectivamente), entretanto o ácido acético encontra-se na condição de - α do planejamento (1,91 g/L). Portanto, como observa-se nos gráficos de Pareto, o ácido acético apresenta a maior influência negativa para o crescimento celular desta linhagem ao final das 48h.

Para a linhagem LADEBIO01 além das condições 1,3 e 13 apresentarem concentrações celulares semelhantes ao controle positivo, a

condição 9 também pode ser considerada próxima ao controle. Nesta condição o ácido acético e o HMF encontram-se nos pontos centrais (12 g/L e 200 mg/L, respectivamente), entretanto o furfural encontra-se em - α (95,5 mg/L) e conforme pode ser observado no gráfico de Pareto, o furfural apresenta o maior efeito inibitório no crescimento celular para esta linhagem.

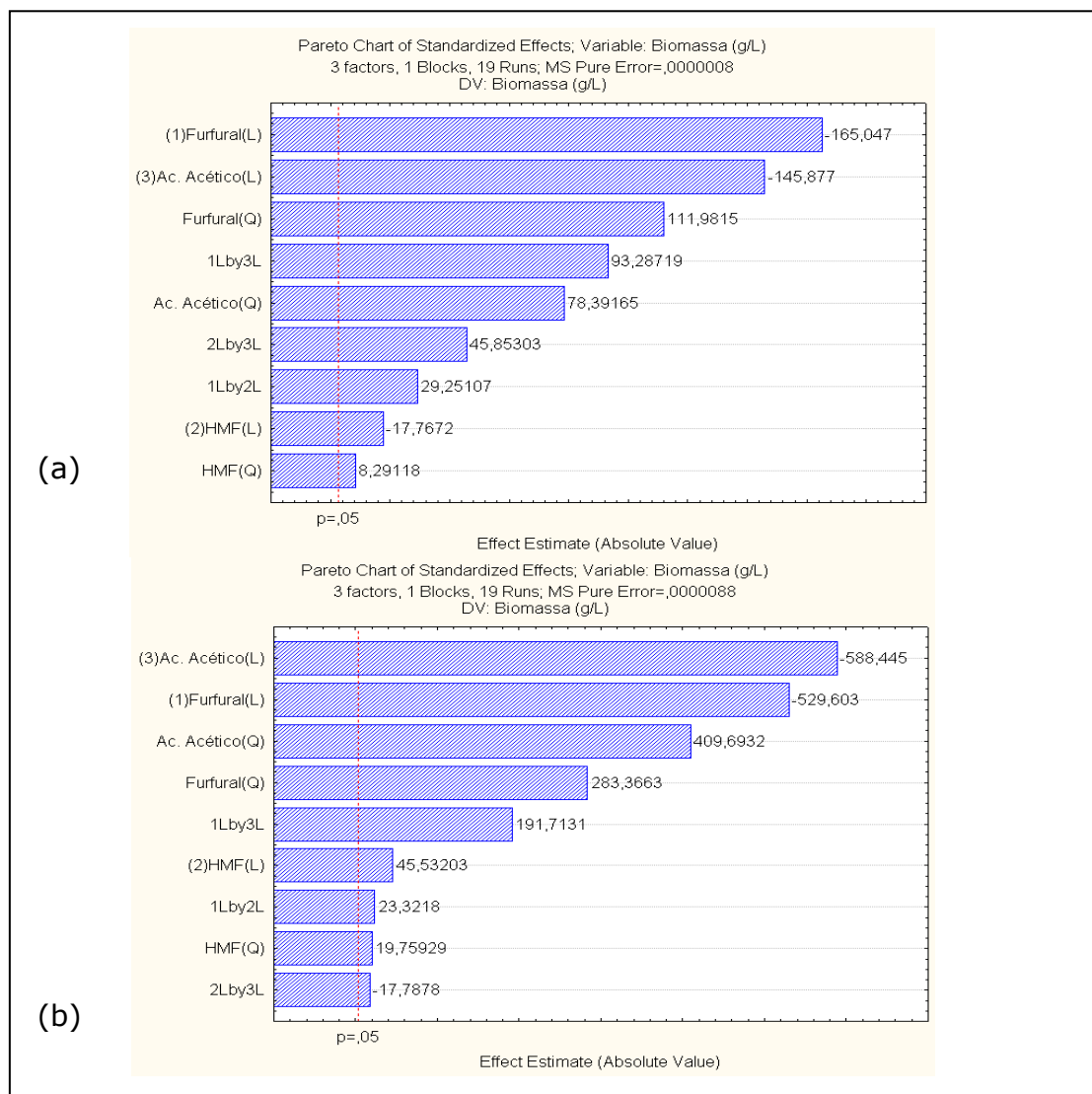


Figura 5.12. Gráficos de Pareto para crescimento celular de CBS5774 na presença de Inibidores celulares de hidrolisado hemicelulósico em 12h (a) e 48h (b).

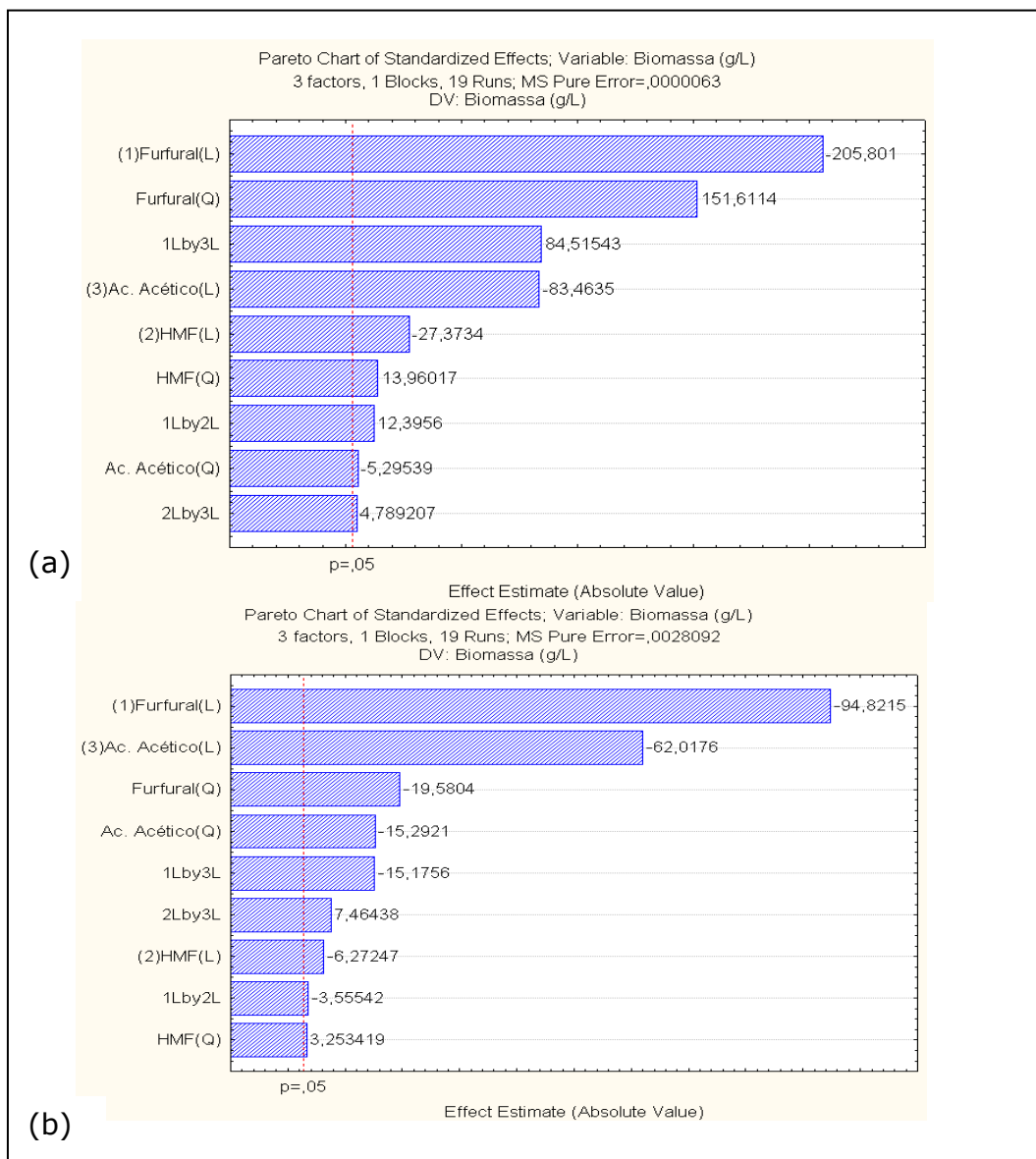


Figura 5.13. Gráficos de Pareto para crescimento celular de LADEBIO01 na presença de inibidores celulares de hidrolisado hemicelulósico em 12h(a) e 48h(b).

A magnitude do efeito estimado de cada variável é apresentada no diagrama de Pareto (Figuras 5.12 e 5.13). No período de 12h, conforme esperado, tem se efeito negativo com significância estatística para todos os inibidores. Sendo o furfural o maior deles, seguido do ácido acético para ambas as linhagens. No período de 48h a magnitude do furfural e do ácido acético para CBS5774, mostrou-se ainda maior, sugerindo a não aclimação da célula a estes inibidores no decorrer das 48h de incubação. O inesperado foi o efeito positivo do HMF, ainda que pequeno quando

comparado ao efeito negativos dos outros dois inibidores. Todavia, para a linhagem LADEBIO01 acontece o oposto, a medida em que o tempo decorre, a magnitude dos efeitos negativos dos inibidores diminui, indicando uma aclimação à presença destes inibidores. Mais uma vez, a linhagem LADEBIO01 exhibe vantagens metabólicas no consumo de xilose na presença dos inibidores celulares provenientes do hidrolisado hemicelulósico.

As figuras 5.14 e 5.15 exibem a superfície de resposta para as linhagens LADEBIO01 e CBS5774, respectivamente, relacionando as duas variáveis de maior influencia (furfural *versus* ác.acético) sobre o processo de crescimento celular após 48h. Em ambas os casos o HMF foi fixado na concentração presente nos pontos centrais (200mg/L), conforme sugerido pelo software STATISTICA 6.1.

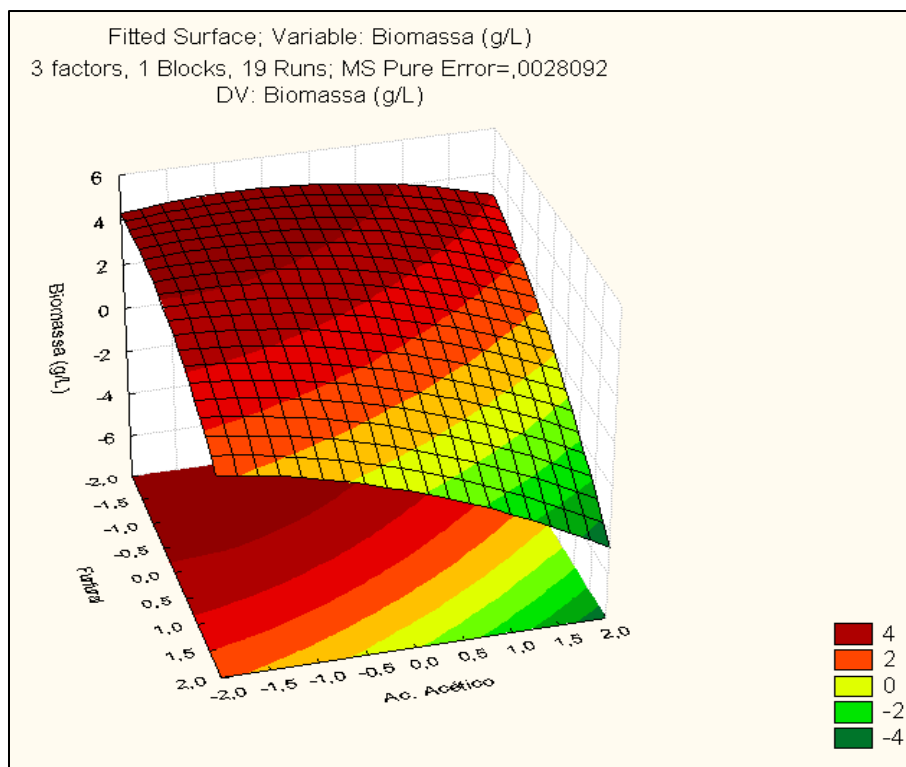


Figura 5.14. Superfície de resposta para os efeitos Negativos do furfural X ác. acético para a linhagem LADEBIO01.

Em geral, o recurso do planejamento experimental visa otimizar processos buscando os efeitos positivos para um determinado fenômeno. Neste caso, como se trata de um estudo sobre efeitos inibitórios, os valores das variáveis tendem a serem negativos e quanto maior o valor absoluto maior o efeito negativo deste inibidor no processo de crescimento celular. Nestas duas figuras verificou-se nitidamente a maior influencia negativa destas substâncias no crescimento microbiano da linhagem CBS5774, pois quanto menor a área vermelha mais sensível o microrganismo se mostra a estes componentes. Uma vez que a esta região representa a faixa onde existe o melhor crescimento microbiano, desta forma, quanto menor esta área, mais estreita a faixa tolerada pelo microrganismo para estas substâncias.

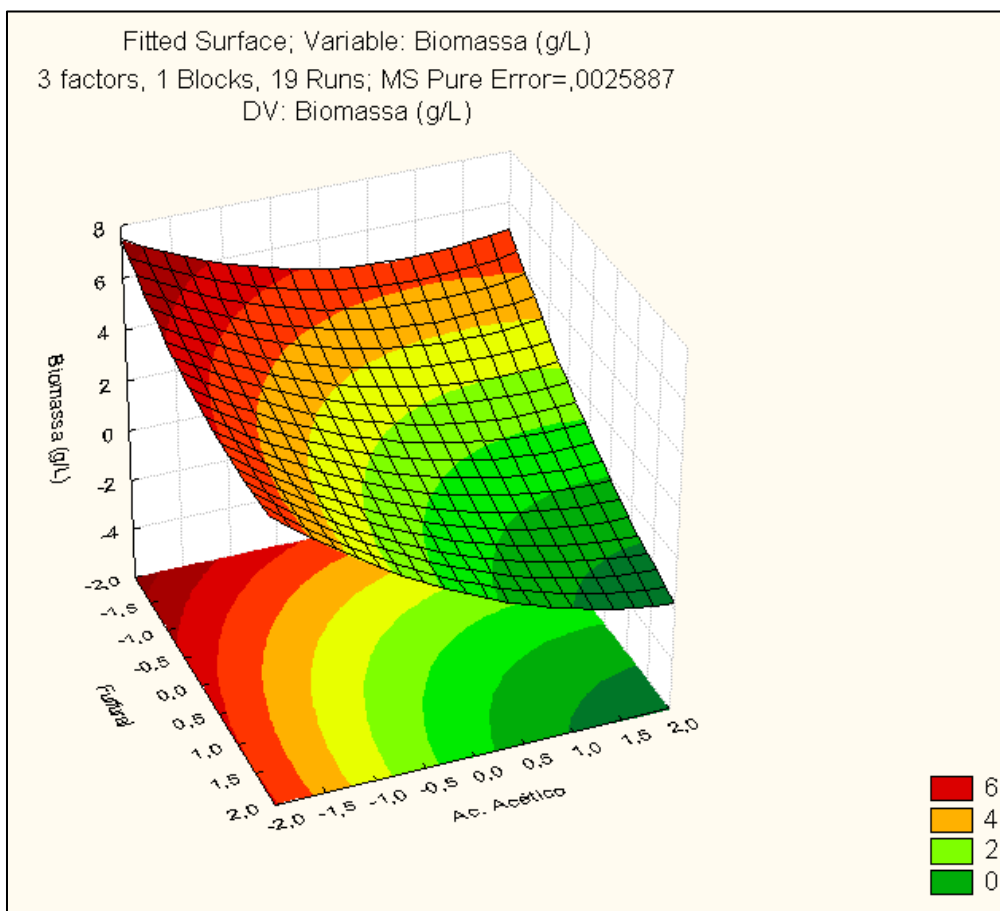


Figura 5.15. Superfície de resposta para os efeitos negativos do furfural X ac. acético para a linhagem CBS5774.

5.3.2. Processo Fermentativo

Após a avaliação do crescimento celular na presença dos inibidores, foi avaliado com as mesmas concentrações destas substâncias a capacidade fermentativa de ambas linhagens. Uma vez que o método analítico para esta variável de resposta (etanol) tenha sido a Cromatografia líquida de alta performance, foram realizadas apenas amostragens no tempo de 24h e 48h visando uma maior praticidade na obtenção dos resultados.

As Tabelas 5.7 e 5.8 exibem as concentrações de xilose e etanol nos períodos de 24 e 48 horas para as linhagens LADEBIO01 e CBS5774, respectivamente.

Tabela 5.7. Concentração de Xilose e etanol em 24 e 48h de fermentação por *P.stipitis* LADEBIO01

Ensaio	Xilose (g/L)		Etanol (g/L)	
	Tempo (h)			
	24	48	24	48
1	15,00	11,65	6,03	16,18
2	34,70	4,17	28,17	5,71
3	18,70	9,59	11,58	15,04
4	32,68	3,72	27,29	6,05
5	15,06	11,61	7,61	15,70
6	30,82	4,55	20,10	5,41
7	16,87	10,04	9,89	16,42
8	48,64	0,30	47,50	0,38
9	31,47	7,56	20,05	9,82
10	23,12	7,65	16,31	14,81
11	25,84	6,28	20,37	9,55
12	25,40	5,95	19,30	9,93
13	13,85	12,86	5,25	16,76
14	35,01	3,59	26,55	5,74
15	25,19	5,86	17,85	10,27
16	27,06	6,85	18,10	10,91
17	23,89	7,94	16,46	11,47
18	22,99	7,91	13,36	12,82
19	24,87	7,02	17,16	12,44
C+	2,3	17,85	0	18,93

Tabela 5.8. Concentração de Xilose e etanol em 24 e 48h de fermentação por *P.stipitis* CBS5774

Ensaio	Xilose (g/L)		Etanol (g/L)	
	Tempo (h)			
	24	48	24	48
1	35,45	5,75	29,46	8,75
2	44,28	0,79	42,13	1,49
3	39,27	2,90	35,68	4,9
4	42,82	0,52	41,73	0,82
5	42,43	2,19	39,96	2,79
6	47,24	0,00	46,94	0
7	44,38	1,85	41,66	2,15
8	45,68	0,00	44,45	0
9	44,28	2,63	42,29	2,93
10	47,27	0,15	45,66	0,24
11	44,80	2,64	43,25	2,94
12	45,10	0,33	44,21	0,46
13	41,06	3,90	38,75	5,6
14	46,18	0,00	44,7	0
15	45,20	1,08	44,98	1,48
16	44,19	0,66	42,65	1,55
17	42,01	0,97	39,75	1,87
18	45,57	1,12	43,21	2,12
19	46,73	0,70	43,94	1,7
C+	4,52	14,56	0	17,84

A análise das tabelas 5.6 e 5.7 permite concluir claramente que tanto a taxa de consumo de substrato quanto a concentração final de produto (etanol) para a linhagem LADEBIO01 mostraram se superiores quando comparados aqueles obtidos para a linhagem CBS5774.

Os gráficos de Pareto das Figuras 5.16 e 5.17 ilustram a magnitude dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de etanol para as linhagens LADEBIO01 e CBS5774, respectivamente. Para a primeira linhagem no período de 24h o ácido acético representa o maior efeito inibitório significativo seguido por um efeito marginalmente inibitório de HMF. Diferentemente do esperado, o furfural não apresenta efeito significativo neste caso. Em contrapartida, no tempo final de 48h, isoladamente, apenas o ácido acético resultou numa relação com significância estatística, seguido por um efeito marginal da interação do

ácido acético com furfural, que isoladamente não obteve efeitos inibitórios significativos.

Como não há relatos na literatura de níveis de tolerância desses compostos químicos tanto para crescimento celular quanto para o processo de fermentação para *P.stipitis* não foi possível comparar estes dados com trabalho algum na literatura até o presente momento.

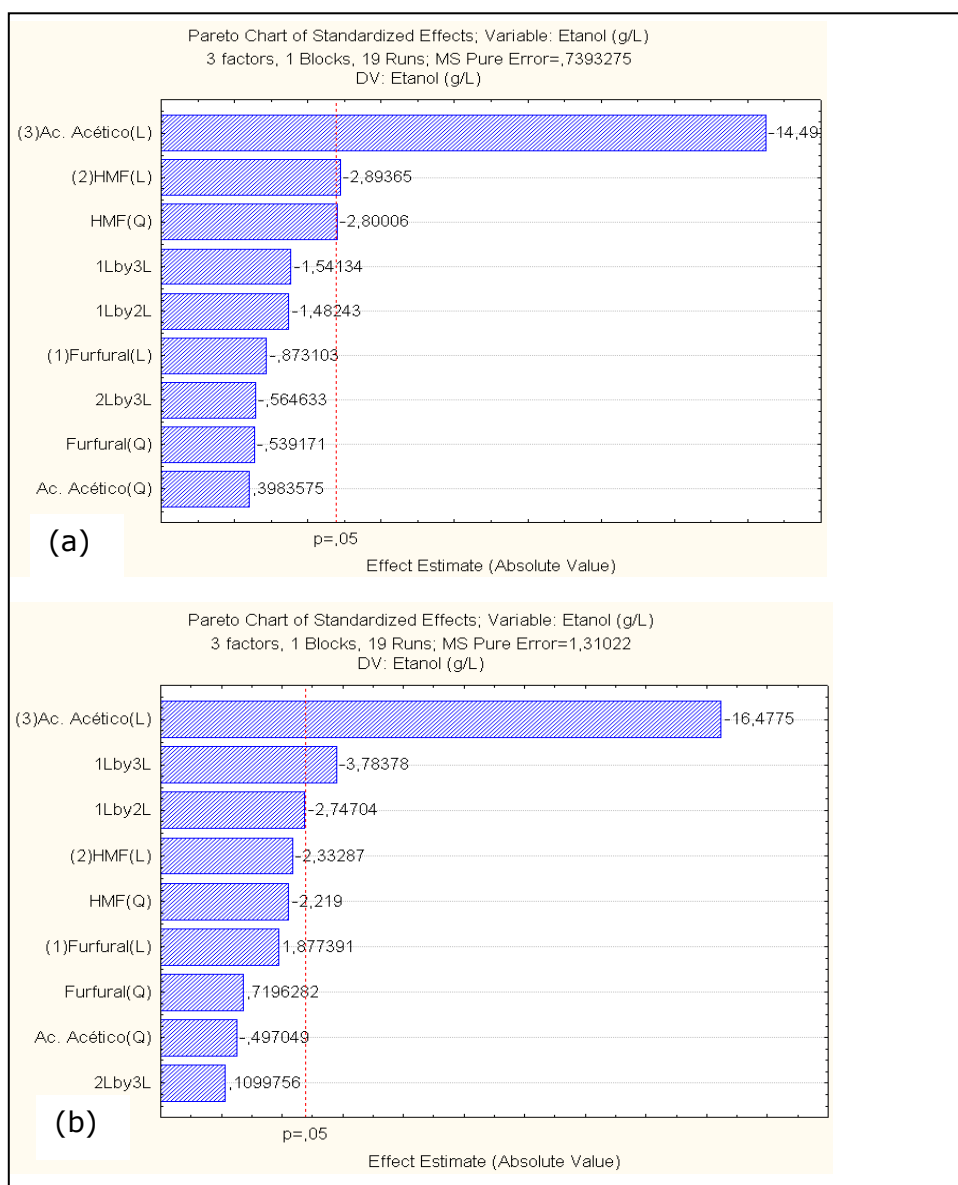


Figura 5.16. Gráfico de Pareto para produção de etanol para linhagem LADEBIO01 nos tempos de 24h (a) e 48h (b).

Para a linhagem CBS5774 (Figura 5.17.), o ácido acético apresentou o maior efeito inibitório, seguido do furfural e HMF, todos com significância estatística tanto para o tempo de 24h quanto 48h.

Em todos os casos, o ácido acético exibiu maior efeito inibidor para todos os ensaios de fermentação, fato até então desconhecido. Entretanto em valores absolutos, pode se observar que a influência das variáveis para a produção de etanol, quando comparadas com o crescimento celular mostrou se menor. Este fato pode estar relacionado à concentração inicial de células utilizada nos ensaios fermentativos serem muito maiores (em torno de 250 vezes maior, em relação aos ensaios de crescimento celular). Mais uma vez, pela ausência de relatos na literatura, estima-se que uma possível razão para essa menor interferência na fermentação seja esta, entretanto mais estudos são requeridos para afirmar conclusivamente se esta realmente seria a razão.

As figuras 5.18 e 5.19 exibem a superfície de resposta envolvendo a magnitude das variáveis independentes mais relevantes ao processo fermentativo da linhagem LADEBIO01 e CBS5774, respectivamente.

Cabe ressaltar que em todas as figuras exibidas de superfície de resposta, as variáveis não exibidas com relevância significativa foram fixadas na condição predita estatisticamente (ponto central, isto é, 200 mg/L).

Dos inibidores, o furfural apresentou influencia negativa com significância apenas para a linhagem CBS5774, sendo assim as variáveis utilizadas para gerar a superfície de resposta para esta linhagem, diferentemente da LADEBIO01, foram o furfural e o ácido acético.

Mais uma vez, observando estas figuras, foi possível notar nitidamente uma maior sensibilidade da linhagem CBS5774 aos inibidores, uma vez que região de maiores concentrações de etanol, restringe se a concentrações muito pequenas destes inibidores, inferiores em valores absolutos quando comparadas a linhagem LADEBIO01.

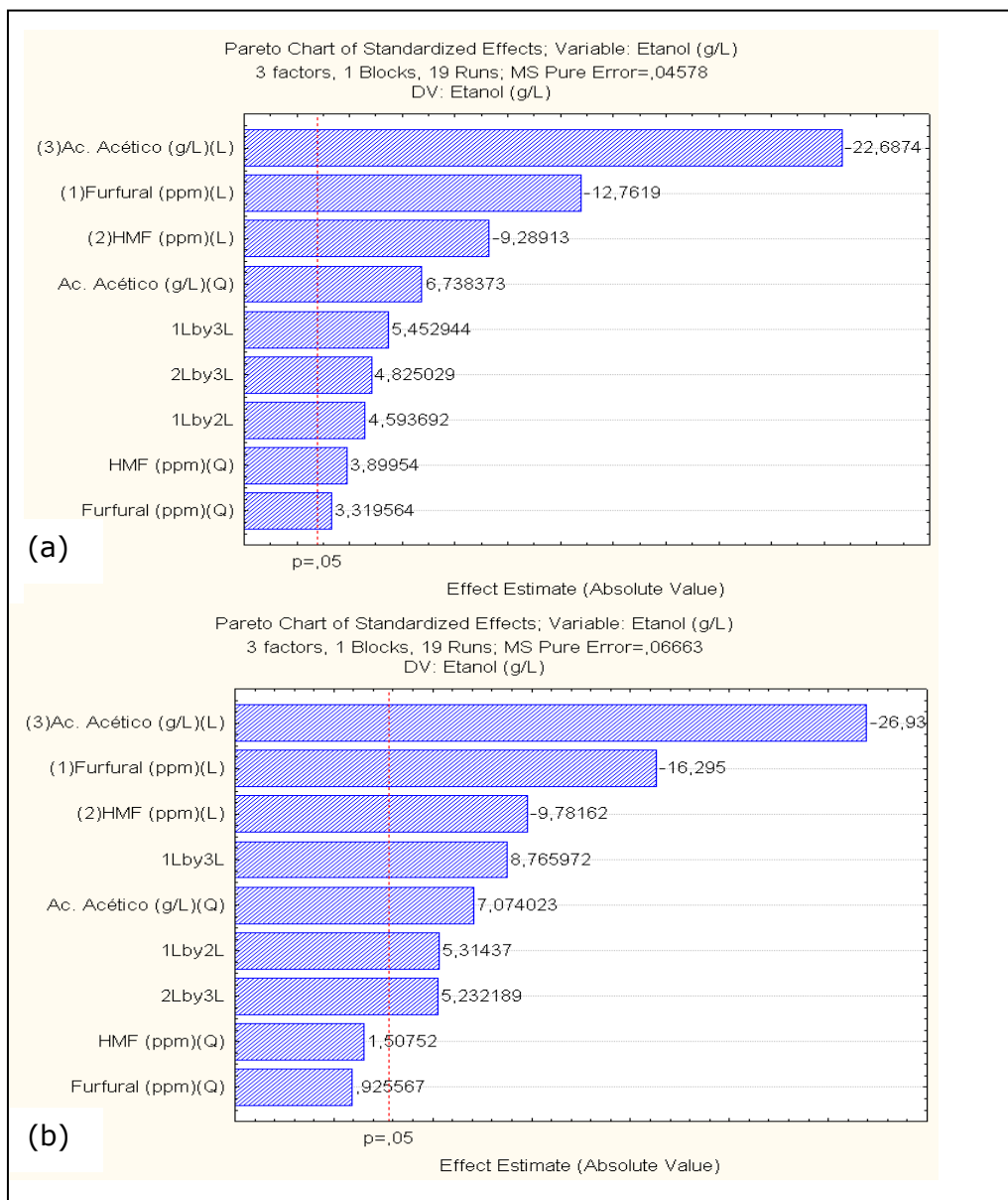


Figura 5.17. Gráfico de Pareto para produção de etanol para linhagem CBS5774 nos tempos de 24h e 48h.

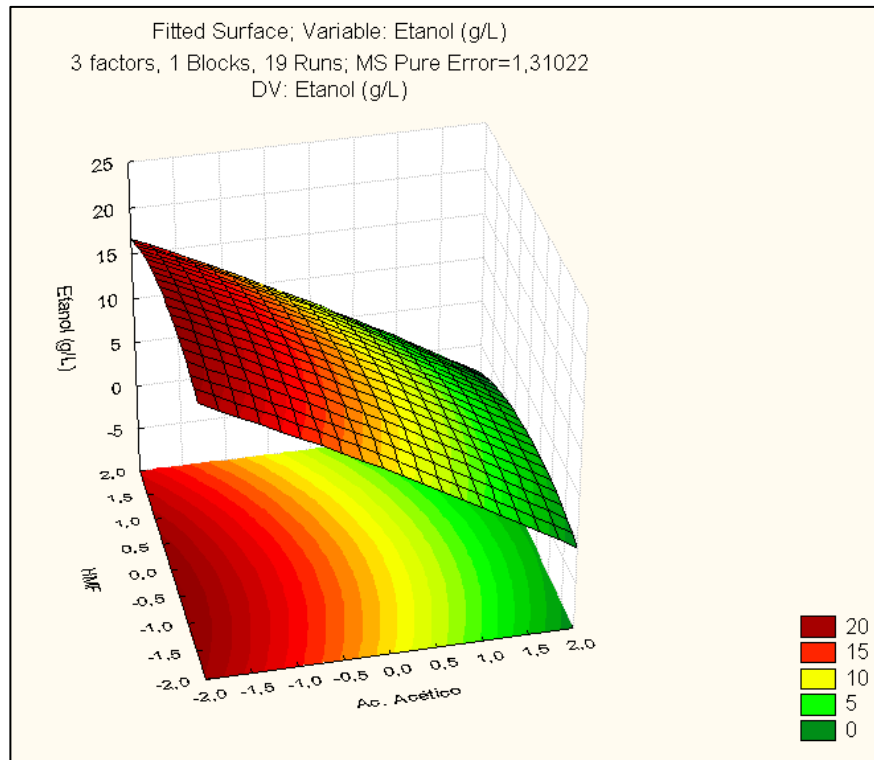


Figura 5.18. Superfície de resposta da concentração de etanol com variações de HMF e ácido acético para a linhagem LADEBIO01.

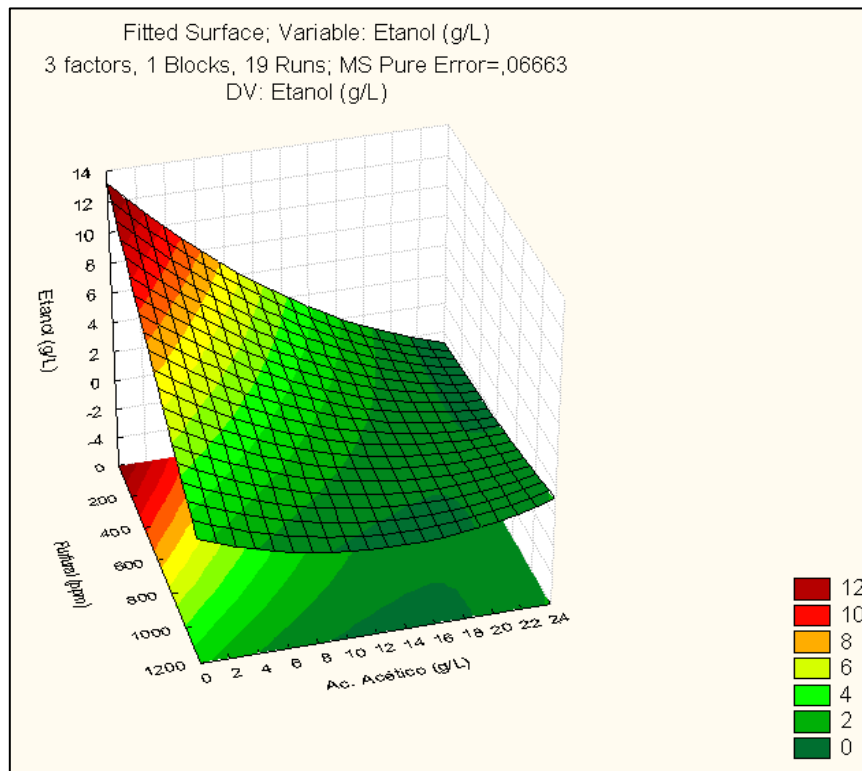


Figura 5.19. Superfície de Resposta da concentração de etanol com variações de furfural e ácido acético para a linhagem CBS5774.

5.4. Caracterização Molecular das Linhagens de *P.stipitis*

Através dos ensaios de cinética de fermentação e de tolerância aos inibidores pelas linhagens abordadas no presente trabalho foi notório e expressiva as diferenças metabólicas tanto para crescimento celular quanto para fermentação alcoólica utilizando xilose proveniente do hidrolisado hemicelulósico não destoxificado como substrato. Fato interessante para alvo de estudos, principalmente por se tratar de uma mesma espécie que foi obtida pelo mesmo banco de cepas e, supostamente, seriam a mesma linhagem. Portanto, há um interesse em buscar uma possível diferença molecular entre estas linhagens, comprovando uma diferença genômica, provavelmente causada pelos efeitos de pressão seletiva gerados pelos inibidores celulares provenientes do pré-tratamento ácido para a linhagem LADEBIO01, fato muito ocorrente na natureza (HAGLER,2009). Estas diferenças poderiam ser tanto mutações propriamente ditas, quanto alguma super expressão de um(ns) gene(s) intimamente relacionado a esta parte do metabolismo celular. Sendo este um estudo complexo podendo ser atribuído a um futuro trabalho de pesquisa.

Enquanto os genes D1/D2 são ribossomais, sendo assim, conservados. Os genes ITS (seqüências intergênicas) são regiões não transcritas e variadas, entretanto são amplamente utilizadas em taxonomia de leveduras (CABRAL, 2009).

A utilização dos genes ITS e D1/D2 possibilitam assegurar primeiramente que as duas linhagens realmente são pertencentes a mesma espécie, descartando uma pouco provável, entretanto possível contaminação. Uma vez que são genes utilizados para identificação de espécies de leveduras na natureza. Em contrapartida, são genes que mesmo dentro de uma mesma espécie podem exibir diferenças, sendo um passo inicial pela busca de diferenças moleculares para estas duas linhagens. Após duas tentativas de amplificação por PCR dessas regiões

não foram obtidos resultados satisfatórios, desta forma não foram exibidos e sugeridos para um futuro trabalho de pesquisa.

5.5. Considerações Gerais

Após todos os ensaios realizados observou-se uma diferença substancial no metabolismo entre as duas linhagens de *P.stipitis* tanto para crescimento celular quanto para a produção de etanol utilizando a xilose oriunda do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de Cana-de-açúcar não destoxificado. Sobretudo, a necessidade de aclimação prévia das células. Após esse processo foi possível observar a capacidade da linhagem LADEBIO01 em metabolizar eficientemente a xilose na presença de concentrações de inibidores cada vez maiores, chegando a níveis como 18g/L de ácido acético, 900 mg/L de furfural e 300mg/L de HMF quando progressivamente aclimatada. Além disso, este processo permitiu uma redução no tempo de fermentação de 40h para 32h, um aumento na produtividade volumétrica de etanol de 0,71 g/L.h quando a linhagem LADEBIO01 foi aclimatada em apenas duas etapas, como descrito por BETANCUR (2005) para 0,84 g/L.h após as aclimações sucessivas, sendo maior, inclusive que a produtividade volumétrica de etanol obtida pela linhagem CBS5774 em meio sintético (0,76 g/L.h) , meio no qual não há inibidor algum.

Desta forma, este fenômeno de aclimação mostra-se de extrema importância em diversos sistemas biológicos e se devidamente explorado pode apresentar aplicações industriais em inúmeros bioprocessos, como por exemplo, no caso do presente trabalho que exhibe potencial tecnológico de *P.stipitis* em fermentar hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana não destoxificado.

Finalmente, como previamente observado, existem prováveis diferenças metabólicas substanciais entre as duas linhagens que surgiram ao longo dos anos, uma vez que, anos atrás, quando iniciados os

bioprocessos utilizando xilose para produção de etanol pelo presente grupo de estudo, ambas as linhagens seriam uma única. Sendo assim, esta diferença torna-se como alvo de estudos para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. Conclusões

- Diferentes condições de hidrólise geram diferentes concentrações de inibidores celulares. Entretanto, ficou demonstrado que é possível o desenvolvimento de eficientes processos de fermentação com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para produção de etanol, pela linhagem de *Pichia stipitis*, em especial a LADEBIO01, sem a implementação de etapas de destoxificação, com células aclimatadas progressivamente.
- De fato existe a necessidade de uma aclimação prévia do microrganismo para a obtenção de um processo fermentativo eficiente. Entretanto, foi demonstrado que após aclimações sucessivas obteve-se crescimento celular e produção de etanol em hidrolisados com concentrações de 18g/L de ácido acético, 900 mg/L de furfural e 300 mg/L de HMF, resultando em concentrações de etanol de 24,62 g/L enquanto com apenas duas aclimações foi de 22,82 g/L.

- Com o decorrer dos anos e, principalmente, após a pressão seletiva submetida a linhagem LADEBIO01 foi possível observar uma melhoria na capacidade de metabolizar o hidrolisado hemicelulósico não destoxificado quando comparado com a linhagem original CBS5774. Desta forma, constatou-se um aumento da produtividade de 0,71 g/L.h (com apenas duas etapas de aclimação) para 0,84 g/L.h após o processo de melhoramento da linhagem.
- Os repiques sucessivos para a linhagem LADEBIO01 possibilitaram valores de produtividade volumétrica muito mais próxima (0,84 g/L.h) ao obtido com meio sintético (0,98 g/L.h) do que os ensaios com hidrolisado realizados até o presente momento (0,71 g/L.h).
- É possível a obtenção de inóculos robustos para a fermentação de hidrolisados sem a utilização de xilose comercial, sendo a etapa inicial do processo (primeira aclimação) realizável diretamente com a xilose contida no hidrolisado hemicelulósico.
- O emprego de técnicas de planejamento experimental permitiu hierarquizar a influência dos inibidores celulares. Para produção de etanol, o ácido acético mostrou a maior influência negativa no processo para ambas as linhagens, seguido do furfural.

6.2 Sugestões

- Apesar de ter sido demonstrada a possibilidade de fermentações com hidrolisado com níveis de produtividade e rendimento para etanol aceitáveis na presença de inibidores celulares, não se deve descartar a realização de estudos que permitam o desenvolvimento de metodologias

para monitorar as possíveis substâncias tóxicas e sua remoção, minimizando ao máximo as perdas de substratos do meio e, principalmente, processos que agreguem baixos custos.

- A viabilização industrial de processos de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico, assim como da estratégia de hidrólise, dependerá tanto do aperfeiçoamento das diferentes etapas necessárias no processo, quanto da realização de estudos técnicos e econômicos que permitam uma escolha apropriada entre diferentes metodologias possíveis;

- Levando-se em consideração a melhoria metabólica exibida pela linhagem LADEBIO01 a principal sugestão do presente trabalho é da pesquisa e comparação das diferenças moleculares exibidas nesta linhagem com a linhagem de *Pichia stipitis* CBS5774 original.

CAPÍTULO 7

7. Referências Bibliográficas

AGBOGBO, F.K.; KELLY-COWARD, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K.S. (2006). Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. Process Biochemistry. V.41 , p. 2333-2336. AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO –ANP- (2009). Anuário estatístico do Ano 2009. Disponível em: www.anp.gov.br. Acesso em: 21 de jan. 2010.

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁSQUEZ, M. (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. Journal of Food Engineering, v. 55 n. 4, p 309-318.

ANTUNES, J.C. (1997). Bioconversão de D-xilose a etanol por células de *Pichia stipitis*. Dissertação de Tese de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

BARBOSA, M.F.S.; LEE, H.; SCHNEIDER, H.; FORSBERG, C.W. (1990). Temperature mediated changes of D-xylose metabolism in the yeast *Pachysolen tannophilus*. FEMS Microbiology Letters, v. 72, p. 35-40.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, O. (1983). Yeasts: Characteristics and identification. Cambridge: Cambridge University Press. 433 p.

BETANCUR, G.J.V. (2005) Avanços em Biotecnologia de Hemicelulose para Produção de Etanol por *Pichia stipitis*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

BETANCUR, G.J.V. (2008) Desenvolvimento de um Bioprocesso para a produção de etanol de hidrolisado hemicelulósico. Exame de Qualificação de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

BRITO, F. (2000). Bioprodução de etanol de hidrolisado de Bagaço de cana utilizando diferentes formas de operação do bioprocessos. Dissertação de Tese de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

BRÜINENBERG, P.M.; DE BOT, P.H.M.; VAN DIJKEN, P.; SCHEFFERS W.A. (1984). NADH Linked Aldose Reductase: the Key to Anaerobic Alcoholic Fermentation of Xylose by Yeast. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 19, p. 256-260.

CABRAL, A. S. (2009). Ecologia de leveduras micocinogênicas e potencial de aplicação como agente de controle biológico. Tese de doutorado.

Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

CARAMEZ, M. (1999) Produção de Endoxilanasas Termoestáveis por *Termomyces lanuginosus* IOC-4145 em Meio Semi-Sólido. Dissertação de Tese de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

COELHO, S. T. Biomassa como fonte de energia. Centro Nacional de referência em biomassa. IEEE/PES. São Paulo, SP. 2004

COELHO, S. T.; VELÁZQUEZ, S. M. S. G.; SILVA, O.C.; MARTINS, O. S.; PECORA, V.; CASTRO, A. F. Energy Generation by a Renewable Source. World Climate and Energy Event. 2006.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira (2008). Terceiro Levantamento, dezembro de 2008. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em janeiro de 2009.

CRUEGER, W; CRUEGER, A. (1993). Biotecnología: Manual de Microbiologia Industrial. Zaragoza: Editora Acribia, Espana, 3ª edição. 414p.

CUZENS, J.C.; MILLER, J.R. (1997). Acid hydrolysis of bagasse for ethanol production. *Renewable Energy*, v. 2/3, n. 10, p. 285-290.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. (1988). Continuous production of ethanol from a glucose, xylose and arabinose mixture by a flocculant strain of *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letter*, v. 10, n. 10, p. 752-730.

DU PREEZ, J.C.; BOSH, M.; PRIOR, B.A. (1986^A). Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: Effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme and Microbiology Technology*, v. 8, n. 6, p. 360-364.

DU PREEZ, J.C.; BOSH, M.; PRIOR, B.A. (1986^b). The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida Shehatae* and *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 3-4, n. 23, p. 228-233.

DU PREEZ, J.C.; BOSH, M.; PRIOR, B.A. (1987). Temperature profiles of growth and ethanol tolerance of the xylose-fermenting yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 521-525.

DU PREEZ, J.C.; VAN DRIESSEL, B.; PRIOR, B.A. (1989). Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida Shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved oxygen levels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p. 53-58.

DU PREEZ, J.C. (1994). Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, n. 11, p. 944-956.

FAIRBANKS, M. (2003). Álcool: Tecnologia amplia oferta e reduz custo do álcool. *Revista: Química e Derivados*, n. 417. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/revista>. Acessado em: 20 jul. 2009.

FERREIRA, V. (2005). Produção de xilanase de *Thermomyces lanuginosus* por *P. pastoris* recombinante em batelada alimentada. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

FOGEL, R. (2004). Otimização da hidrólise ácido de Bagaço de cana-de-açúcar e utilização do hidrolisado na produção de xilitol por *Candida guilliermondii*. Dissertação de Tese de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

FOGEL, R.; GARCIA, R.; OLIVEIRA, R.; PALACIO, D.; MADEIRA, L.; PEREIRA Jr, N. (2005). Optimization of acid hydrolysis of sugarcane bagasse and investigations on its fermentability for production of xylitol by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, p. 741-752.

GOLDEMBERG, J.; TEIXEIRA, C.S.; LUCON, O. How adequate policies can push renewables. *Energy Policy*, Elsevier, 2004.

GOMES, E.B. (2008). Biotratamento de resíduo oleoso da indústria do petróleo por batelada sequencial e avaliação de ecotoxicidade. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Bioprocessos Químicos e Bioquímicos, universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil.

GONG, C.S.; CHEN, L.F.; FLICKINGER, M.C.; CHIANG, L.C.; TSAO, G.T. (1981). Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. *Applied Environmental Microbiology*, v. 41, n. 2, p. 430-436.

GUEBEL, D.V.; CORDENONS, A.; NUDEL, B.C.; GIULIETTI, A.M. (1991). Influence of oxygen transfer rate and media composition on fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnology Letters*, v. 14, n. 12, p. 1193-1198.

GUTIÉRREZ, T.; BUSKO, M.L.; INGRAM, L.O.; PRESTON, J.F. (2002). Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanologenic strains of

bacteria and its effect on ethanol production from xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 327-340.

HAGLER, A. N. (2009); Comunicação Pessoal.

HAHN-HÄGERDAL, B.; LINDÉN, T.; SENAC, T.; SKOOG, K. (1991). Ethanolic fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 28-29, p. 131-144.

JEFFRIES, T.W.; GRIGORIEV, I.V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J.M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. (2007). Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature biotechnology*, v. 25, n.3, p.319-326.

KASTNER, J.R.; AHMAD, M.; JOJNES, W.J.; ROBERTS, R.S. (1996). Effect of pH on cell viability and product yields in D-xylose fermentation by *Candida shehatae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45, p. 224-228.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73: 331-371, 1998.

LAMONICA, H. M. (2005) Geração de energia elétrica a partir da biomassa de cana; In: SEMINÁRIO BIOELETRICIDADE, 3. 2005, Rio de Janeiro. Anais eletrônicos. Rio de Janeiro: BNDES. Palestra. Disponível em: http://www.inee.org.br/downloads/eventos/Geracao_EE_Biomassa_Cana_Lamonica_BNDES_2005.pdf. Acesso: Nov. 2009.

LAPLACE, J.M.; DELGENES, J.P.; MOLETA, R.; NAVARRO, J.M. (1991). Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selec

microbial strains: Process consideration in relation to ethanol tolerance. *Biotechnology Letters*, v. 13, p. 445-450.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄRDERGAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N.O. (1998). The generation of fermentation inhibitors during acid hydrolysis of soft-wood. *Enzyme and Microbiology Technology*, v. 24, p. 151-159.

LASER, M.; SCHUNAB, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J.; ANTAL Jr., M.J.; LYND, L.R. (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*, n. 81, p. 33-44.

LAVARACK, B.P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. (2000). Measured kinetics of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse to produce xylose. *Catalysis Today*, v. 63, p. 257-265.

LEAL, M. L. (1998). Reciclo Celular na Produção Contínua de Etanol a Partir de D-Xilose com uma Linhagem Floculante de *Pichia stipitis*. Dissertação de Tese de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

LEE, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, v. 56, p. 1-24.

LEMOS, J.L.S. (2001). Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana. Dissertação de Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

LIGTHELM, M.E.; PRIOR, B.A.; DU PREEZ, J.C.; BRANT, V. (1988). An investigation of D-(1-C¹³) xylose metabolism in *Pichia stipitis* under aerobic and anaerobic condition. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 28, p. 293-296.

LOHMEIER-VOGEL, E.; SKOOG, K.; VOGEL, H.; HAHN-HÄGERDAL, B. (1989). ³¹P nuclear magnetic resonance study of effect of azide on xilose fermentation by *Candida tropicalis*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 55, p. 1974-1980.

LORA, E.S.; ANDRADE, R.V. Biomass as energy source in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.13, p.777-788, 2009.

LMC INTERNATIONAL. Ethanol Quartely - First Quarter 2008. (2008). Disponível em: <http://www.lmc.co.uk/Reports.aspx?Id=3>. Acesso em: 17 Dez. 2009.

MACKIE, K.L.; BROWNELL, H.H.; WEST, K.L., SADDLER, J.N. (1995). Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood. *Journal of wood Chemical Technology*, v. 5, p. 405-425.

MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H.N.; WIKE, C.R. (1983). Economic evaluation of alternative ethanol fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 26, p. 1003-1024.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. (2009). Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, v.100 , p. 2392-2398.

MEYRIAL, V.; DELGENES, J.P.; ROMIEU, C.; MOLETTA, R.; GOUNOT, A.M. (1995). Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in

Pichia stipitis grown on D-xylose or on D-glucose. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 17, p. 535-540.

MICHELLON, E.; SANTOS, A. A. L.; RODRIGUES, J. R. A. Breve descrição do Pró Álcool e perspectivas futuras para o etanol produzido no Brasil. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. (2009) Relação das unidades produtoras cadastradas no departamento da cana-de-açúcar e agroenergia. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: abril/2009.

MOREIRA, J.R.; GOLDEMBERG, J. (1999). The alcohol program. *Energy Policy*, v. 27, n. 4, p. 229-245.

MUSSATO, I.S.; ROBERTO, I.C. (2002) Produção Biotecnológica de Xilitol a Partir da Palha de Arroz. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. v. 28, p. 24-39.

NELSON, D. L.; COX, M. M.(2002). *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3 ed. Sarvier, p. 846-877.

NIGAM, J.N. (2001). Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 26, p. 145-150.

OLSSON, L; HAHN-HÄGERDAL, B. (1996) Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production. *Enzyme Microbial Technology*, v. 18, p. 312-331.

PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N.Q.; HAHN-HÄGERDAL, B. (1999). Main and interaction effects of acid acetic, furfural, and p-

hydroxybenzoic acid on growth and ethanol production of yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 63, n. 1, p. 46-55.

PALMQVIST, E. & HAHN-HÄGERDAL. B. (2000). Fermentation of lignocellulose hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 25-33.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. E.; SOCCOL, V.T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, vol. 74, n. 1, p. 69-80.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. (1998^A). Biotechnological Production of xilitol. Part I: Interest of xilitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*, v. 65, n.3, p. 191-201.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. (1998^B). Biotechnological Production of xilitol. Part III: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*, v. 66, p. 25-40.

PEREIRA Jr., N. (1991). Investigation of D-xylose fermenting yeast. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry. The University of Manchester, U.K.

PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. Series on biotechnology, Pereira Jr., N. (Ed.), 2008, v. 2, 47 p.

PEREIRA JR., N; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de Bioprocessos. Séries em Biotecnologia. Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro, v. I, 2008. 62p.

PEREIRA JR., N. 2010. Comunicação pessoal.

PEREIRA, R.E. (2006) Avaliação do Potencial Nacional de Geração de Resíduos Agrícolas para Produção de Etanol. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

PIACENTE, E. A. Perspectivas do Brasil no Mercado Internacional de Etanol. 2006. 57p. Dissertação de Tese de Mestrado em Planejamento de Sistemas Energéticos - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

POUTANEN, K.; PLUS, J.; NIEMELÄ, K.; BUCHERT, J. (1990). Improvement in the fermentability of steamed hemicellulose hydrolysate by ion exclusion. *Process Biochemistry International*, October, p. 176-180.

PROCANA – Jornal da Cana. Você em dia com o Setor. Disponível em: <http://www.canaweb.com.br>. Acessado em: 15 Jan. 2010.

PROINFA - Programa de Incentivo às Fontes Alternativas de Energia Elétrica, Lei 10.438/2002. Disponível em: www.mme.gov.br/programas/proinfa. Acessado em: 18 Dez. 2009.

RIZZI, M.; KLEIN, C.; SCHULTZE, C. BUI-THANH, N.; DELLWEG, H. (1989). Xylose fermentation by yeasts. 5. Use of ATP balances for modeling oxygen limited growth and fermentation with the yeast *Pichia stipitis* with xylose as a carbon source. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 34, p. 509-514.

ROBERTO, I.C.; LACIS, L.S.; BARBOSA, M.F.S.; MANCILHA, I.M. (1991). Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia*

stipitis for the production of ethanol. *Process Biochemistry*, v. 26, p. 15-21.

RODRÍGUEZ-CHONG, A.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. (2004). Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering*, v. 61, p. 143-152.

ROSA, C. A.; PETER, G. In the *Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer. Verlag Berlin Heidelberg, 2006.

ROSEMBERG, S.L. (1980). Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms. *Enzyme Microbial Technology*, v. 2, p. 1985-1993.

SÁ, M.C.A. (1993). Efeito do grau de aeração na produção de xilitol por bioconversão. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

SCANDIFFIO, M. I. G. Análise Prospectiva do Álcool Combustível no Brasil - Cenários 2004-2024. 2005. 182p. Dissertação de Tese de doutorado em Planejamento de Sistemas Energéticos - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.S.; AQUARIBE, E.; BORZANI, W. (2001^A). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*, 2v. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1 edição. 541 p.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.S.; AQUARIBE, E.; BORZANI, W. (2001^B). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*, 3v. São Paulo : Editora Edgard Blucher, 1^o edição. 544 p.

SCHNEIDER, H. (1989). Conversion of pentoses to ethanol by yeasts and fungi. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, v. 9, p. 1-40.

SECEX – Secretaria do Comércio exterior. (2009). Ministério do desenvolvimento, Indústria e Comercio exterior. Disponível em: <http://www2.desenvolvimento.gov.br>. Acessado em: 15 Jan. 2010.

SOMAVILLA, C.; GOMES NETO, E. H. (2005) Etanol e as células combustíveis. *Brasil H2 Fuel Cell Energy*. Disponível em: <http://www.celulaacombustivel.com.br>. Acessado em: 20 Ago. 2009.

SOMERVILLE, C. (2007). Biofuels. *Current Biology*, v.17, n.4 , p.115-119.

SORIANO, A. U. (1998). Biodegradação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria de Petróleo. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Bioprocessos Químicos e Bioquímicos, universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil.

SHLESER, R. (1994). Ethanol production in Hawaii. State of Hawaii, Department of Business, Economic Development and Tourism. Disponível em: <http://www.hawaii.gov/dbet/ert/ethanol>. Acessado em: 20 Ago. 2009

SKOOG, K.; JEPPSSON, H.; HAHN-HÄGERDAN, B. (1992). The effect of oxygenation on glucose fermentation with *Pichia stipitis*. *Scientific Note. Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 34-35, p. 369-375.

SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J.; OKOS, M.R.; LADISCH, M.R. (1985). Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentration. *Biotechnology Letters*, v. 7, p. 431-436.

SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J.; LADISCH, M.R.; OKOS, M.R. (1990). Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, p. 727-731.

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

TOSETTO, G.M. (2008) Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melão de cana-de-açúcar na produção de Bioetanol. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

USDA – United States Department of Agriculture. (2009). Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/wap/circular/2009/09-04/productionfull04-09.pdf>. Acesso em: 12 Dez. 2009.

VALENTE, P.; GOUVEIA, F.C.; LEMOS, G.A.; PIMENTEL, D.; VAN ELSAS, J.D.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A. N. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 137; 253-256,1996.

VALENTE, P.; GOUVEIA, F.C.; LEMOS, G.A.; PIMENTEL, D.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A. N. PCR amplified ITS length variation within the yeasts genus *Metschnikowia*. *Journal General Applied microbiology*, 43: 179-181, 1997.

VEIGA FILHO, A. Fatores explicativos da mecanização do corte na lavoura canavieira paulista. *Informações Econômicas*, São Paulo, v. 28, n. 11, p. 7-33, nov. 1998.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172 (8): p. 4238-4246. 1990.

ZANCANER, L. G. (2008). Pró Álcool - Programa Brasileiro de Álcool. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/proalcool/pro-alcool.htm>. Acesso em: 10 jan. 2010.