



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MILENA CONTE

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE ACEROLA E
UTILIZAÇÃO COMO MEIO DE CULTURA EM FERMENTAÇÃO COM
Saccharomyces cerevisiae RECOMBINANTE PARA APROVEITAMENTO DE
ARABINOSE**

FLORIANÓPOLIS – SC

2023

MILENA CONTE

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE ACEROLA E
UTILIZAÇÃO COMO MEIO DE CULTURA EM FERMENTAÇÃO COM
Saccharomyces cerevisiae RECOMBINANTE PARA APROVEITAMENTO DE
ARABINOSE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito para a obtenção do título
de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Poletto

FLORIANÓPOLIS

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Conte, Milena
OBTENÇÃO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE ACEROLA E
UTILIZAÇÃO COMO MEIO DE CULTURA EM FERMENTAÇÃO COM
Saccharomyces cerevisiae RECOMBINANTE PARA
APROVEITAMENTO DE ARABINOSE/Milena Conte ; orientadora,
Patrícia Poletto, 2023.
82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Resíduo de acerola. 3.
Pentoses. 4. Fermentação. 5. Saccharomyces cerevisiae
Recombinante. I. Poletto, Patrícia . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Milena Conte

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE ACEROLA E
UTILIZAÇÃO COMO MEIO DE CULTURA EM FERMENTAÇÃO COM
Saccharomyces cerevisiae RECOMBINANTE PARA APROVEITAMENTO DE
ARABINOSE**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Poletto - Presidente - UFSC
Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk - Membro Externo - UFSC
Prof^ª. Dr^ª. Jaciane Lutz Ienczak - Membro Interno - UFSC

Certificamos que esta é a versão **original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof^ª. Jaciane Lutz Ienczak, Dra.
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof^ª. Patrícia Poletto, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir utilizar a sabedoria e inteligência para sempre estar evoluindo.

À minha família, meus pais Brás e Marli Conte e minha irmã Camila Conte por serem os pilares da minha vida e os meus maiores incentivadores em todos os momentos.

À família do coração que o Mestrado me proporcionou, Shirley Clyde Rupert Brandão e Marcel Bueno Santana Júnior, ao nosso laço e memórias felizes e gratas construídas neste período.

À Isabela de Oliveira Pereira, que me guiou durante a execução deste trabalho com todo o seu conhecimento, sempre com entusiasmo, boa vontade e zelo pelo seu trabalho e o trabalho dos colegas.

À Juliane da Silveira, Júlia de Matos, Eduardo Leonarski, Lauren Soares e Karina Cesca pelo companheirismo e ajuda na execução das análises.

Ao Eduardo Zanella por toda a contribuição na realização de todas as análises cromatográficas.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Patrícia Poletto pelo acompanhamento e condução deste trabalho.

Estendo minha gratidão a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela oportunidade de realização do Mestrado e ao órgão de fomento CAPES pela contribuição.

RESUMO

A acerola é uma fonte muito rica de diversos compostos bioativos e açúcares. O bagaço de acerola é uma importante biomassa devido ao seu conteúdo de carboidratos e ótimo potencial para produção de produtos de alto valor agregado. O Brasil possui domínio de sua exportação e faz o seu beneficiamento de forma industrial. De cerca de 70.000 toneladas de acerola produzidas, 30% deste volume é bagaço, descartado pela indústria de sucos. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial fermentativo da levedura recombinante *S. cerevisiae* MP-C5H1, capaz de consumir a xilose, utilizando o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de acerola, rico em pentoses provenientes da fração hemicelulósica, como meio de cultura. A fim de produzir um hidrolisado hemicelulósico rico em açúcares (xilose, arabinose, glicose), para fermentação, uma hidrólise ácida foi realizada com 0,5, 1,0 e 1,5% de H₂SO₄ diluído. O rendimento de extração da xilose e arabinose, baseados na composição lignocelulósica do bagaço de acerola, foram superestimados, o que pode estar relacionado com a presença de arabinose de cadeias de pectina, não previsto no protocolo de caracterização. O hidrolisado hemicelulósico com concentração de ácido diluído de 1,5% H₂SO₄ foi escolhido para fermentação em biorreator, em batelada devido aos bons resultados obtidos na extração dos açúcares. As hidrólises proporcionaram concentrações de açúcares de 8,9 g/L para xilose, 5,4 g/L para arabinose, 1,3 g/L para glicose e 3,9 g/L para celobiose. Para realização da fermentação, o hidrolisado foi preparado e concentrado aproximadamente 5 vezes, seguido de uma hidrólise enzimática, atingindo as seguintes concentrações: 29,3 g/L de xilose, 23 g/L de arabinose, 12,4 g/L de glicose e 6,1 g/L de celobiose. Considerando a alta concentração de arabinose encontrada no hidrolisado, fez-se uma fermentação prévia com diferentes concentrações totais de açúcar em meios sintéticos, sendo o meio A (100 g/L – (40 g/L de xilose, 27 arabinose e 23 glicose)) e meio B (204 g/L (80 g/L de xilose, 54 arabinose e 46 glicose) para avaliar a interferência da alta concentração de arabinose no meio de cultura. Nos meios sintéticos fermentados em frascos agitados, não houve interferência da alta concentração de arabinose e não houve seu consumo, mas houve repressão catabólica pelo excesso de glicose no meio sintético B. No meio sintético A, a xilose e a glicose foram 100% consumidas até 24 h e a produtividade volumétrica global de etanol foi (1,97 g/L/h) e para xilitol (0,81 g/L/h). No meio sintético B, a glicose foi 100% consumida nas primeiras 24 h, porém a xilose só foi esgotada após 48 h. A produtividade volumétrica global de etanol foi (1,90 g/L/h) e para xilitol (0,65 g/L/h). Na fermentação do hidrolisado hemicelulósico, xilose e a glicose foram consumidas apenas 53% de 84,5% do seu conteúdo inicial, respectivamente, até 9 h de processo e foi alcançado uma produtividade volumétrica global de etanol de (1,07 g/L/h) e de (0,20 g/L/h) para xilitol. Não houve consumo da arabinose. Destaca-se que com os parâmetros cinéticos avaliados na fermentação com o hidrolisado hemicelulósico de acerola nos indica perspectivas de utilização como meio de cultura e demonstra potencial para a produção de produtos de alto valor agregado através da fermentação como etanol, xilitol e arabinose.

Palavras-chave: Resíduo de acerola; Pentoses; Fermentação.

ABSTRACT

Acerola is a rich source of several bioactive compounds and sugars. Acerola bagasse is an important biomass due to its carbohydrate content and great potential for production of high value-added products. Brazil is in control of its exports and transformation from it industrially. Of the approximately 70,000 tons of acerola produced, 30% of this volume is bagasse, discarded by the juice industry. The aim of this study was to evaluate the fermentative potential of the recombinant yeast *S. cerevisiae* MP-C5H1, capable of consuming xylose, using the hemicellulosic hydrolyzed of acerola bagasse, rich in pentoses from the hemicellulosic fraction, as a culture medium. In order to produce hydrolyzed rich in sugars (xylose, arabinose, glucose) for fermentation, tests with diluted acid hydrolysis were performed with 0.5, 1.0 and 1.5% (H₂SO₄). The extraction yield of xylose and arabinose, based on the lignocellulosic composition of the acerola bagasse, was overestimated, which may be related to the presence of arabinose from the structure of pectin, not foreseen in the chemical characterization protocol. The hydrolyzed with a diluted acid concentration of 1.5% H₂SO₄ was chosen for fermentation in a bioreactor, in a single batch, due to the good results obtained in obtaining the sugars. The hydrolysis achieved sugar concentrations of 8.9 g/L for xylose, 5.4 g/L for arabinose, 1.3 g/L for glucose, and 3.9 g/L for cellobiose. To complete the fermentation, the hydrolyzed was prepared and concentrated approximately 5 times, followed by enzymatic hydrolysis, reaching the following concentrations: 29.3 g/L of xylose, 23 g/L of arabinose, 12.4 g/L of glucose and 6.1 g/L cellobiose. Considering a high concentration of arabinose found in the hydrolyzed, a previous fermentation was carried out with different total sugar concentrations in synthetic media, with medium A (100 g/L - (40 g/L of xylose, 27 arabinose, and 23 glucose)) and medium B (204 g/L (80 g/L of xylose, 54 arabinose, and 46 glucose) to evaluate the interference of the high concentration of arabinose in the culture medium. In the synthetic media fermented in agitated flasks, there was no interference with the high concentration of arabinose and there was no consumption, but there was catabolic repression by excess glucose in synthetic medium B. In synthetic medium A, xylose and glucose were 100% consumed within 24 h and the global volumetric productivity of ethanol was (1.97 g/ L/h) and xylitol (0.81 g/L/h). In synthetic medium B, glucose was 100% consumed in the first 24 h, but xylose was only depleted after 48 h. The global volumetric productivity of ethanol was (1.90 g/L/h) and xylitol (0.65 g/L/h). In the hydrolyzed fermentation, xylose and glucose were consumed only 53% of 84.5% of its initial content, respectively, up to 9 h of process, and a global ethanol volumetric productivity of (1.07 g/L/h) and (0.20 g/L/h) was achieved for xylitol. There was no consumption of arabinose. It is noteworthy that the kinetic parameters evaluated in fermentation with acerola hydrolyzed, indicate perspectives for use as a culture medium and demonstrate the potential to produce high-value-added products through fermentation such as ethanol, xylitol, and arabinose.

Keywords: Acerola Residue; Pentoses; Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral da produção industrial de suco de acerola e os principais resíduos gerados (bagaço e borra).....	18
Figura 2 - Bagaço seco de acerola constituído de sementes e peles.....	32
Figura 3 - Resumo das análises de pré-tratamento	38
Figura 4 - Biorreator New Brunswick BioFlo 110 de 5 L, durante a realização da propagação.	40
Figura 5 - Etapas da propagação da levedura.	40
Figura 6 - Fermentações nos meios sintéticos A e B.....	43
Figura 7 - Biorreator New Brunswick BioFlo 115 de 1,5 L alimentado com o hidrolisado hemicelulósico do resíduo de acerola durante o processo fermentativo.	44
Figura 8 - Fermentação do hidrolisado hemicelulósico.....	44
Figura 10 - Balanço de massa das etapas de caracterização, hidrólise ácida, aumento de escala e hidrólise enzimática.	54
Figura 11 - Cinética de propagação da <i>S. cerevisiae</i> MP-C5H1 em regime de batelada alimentada. A seta indica o início da alimentação da glicose.	57
Figura 12 - Perfil de crescimento celular da <i>S. cerevisiae</i> MP-C5H1 em biorreator. Os coeficientes angulares das regressões lineares indicam μ_{max} distintos para os regimes de condução em batelada e batelada alimentada.	58
Figura 13 - Avaliação do crescimento celular, evolução do consumo de substrato (glicose e xilose) e formação de produtos (etanol, xilitol, glicerol) em meio hemicelulósico sintético com diferentes concentrações de açúcares.	60
Figura 14 - Avaliação do crescimento celular, evolução do consumo de substrato (glicose e xilose) e formação de produtos (etanol, xilitol, glicerol) em meio hemicelulósico obtido do resíduo de acerola.	64
Figura 15 - Leitura da viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> MP-C5H1 de amostra coletada durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de resíduo de acerola através de microscopia em câmara de Neubauer.....	68
Figura 16 - Perfil de velocidade específica de consumo (μS) de glicose e xilose e perfil de velocidade de formação de produtos (μP), nos ensaios de fermentação do hidrolisado hemicelulósico obtido do resíduo de acerola e com o meio sintético de diferentes concentrações A e B.....	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Meios de cultura utilizados nas etapas de pré-inóculo e inóculo em <i>shaker</i> e propagação da levedura em biorreator.....	39
Quadro 2 - Meios de cultura utilizados na etapa de fermentação dos meios sintéticos em <i>Shaker</i>	42
Quadro 3 - Parâmetros cinéticos usados para avaliação das etapas de propagação e fermentação.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Faixas de valores médios de composição físico-química de resíduo de acerola (sementes, cascas e polpa).	19
Tabela 2 - Caracterização química do bagaço de acerola e sólido insolúvel recuperado dos pré-tratamentos.....	48
Tabela 3 - Concentração de analitos presente nos hidrolisados obtidos nos pré-tratamentos com ácido diluído, após concentração por evaporação e após hidrólise enzimática.	50
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos da propagação da <i>S. cerevisiae</i> MP-C5H1 em batelada alimentada com meio contendo glicose.....	58
Tabela 5 - Resultados gerais das fermentações em <i>shaker</i> com a levedura <i>S. cerevisiae</i> MP-C5H1 em meio sintético A ($\cong 100$ g/L) e meio sintético B ($\cong 204$ g/L) e em biorreator com hidrolisado hemicelulósico obtido do resíduo de acerola.....	62
Tabela 6 - Resultados obtidos da literatura de fermentações com diferentes hidrolisados hemicelulósicos e linhagens de levedura capazes de fermentar a xilose.....	65
Tabela 7 - Análise da viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> MP-C5H1 de amostra coletada durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de resíduo de acerola.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA - Bagaço de acerola

HMF – Hidroximetilfurfural

CFT – Compostos fenólicos Totais

OGM - Organismo Geneticamente Modificado

Q_p - Produtividade volumétrica global de etanol (g/L/h)

Q_x - Produtividade volumétrica global de célula (g/L/h)

$Y_{p/s}$ - Fator de conversão de substrato em etanol (g/g)

$Y_{\text{etanol}/s}$ - Fator de conversão de substrato em etanol (g/g)

$Y_{\text{xilitol}/s}$ - Fator de conversão de substrato em xilitol (g/g)

$Y_{\text{glicerol}/s}$ - Fator de conversão de substrato em glicerol (g/g)

$Y_{x/s}$ - Fator de conversão de substrato em célula (g/g)

η - Rendimento (%)

μ_x – Velocidade específica de crescimento

$\mu_{x_{\text{max}}}$ – Velocidade máxima específica de crescimento

μ_s - Velocidade específica de consumo de substrato

μ_p – Velocida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	RESÍDUO DE ACEROLA.....	17
2.1.1	Composição lignocelulósica do bagaço de acerola	18
2.2	DEFINIÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA LIGNOCELULÓSICA	19
2.3	METODOLOGIAS PARA ACESSAR AS CADEIAS DE POLISSACARÍDEOS DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓICAS	22
2.3.1	Hidrólise ácida	22
2.3.2	Hidrólise enzimática	24
2.4	FERMENTAÇÃO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	26
2.4.1	Arabinose presente no hidrolisado hemicelulósico	27
2.4.2	Perspectivas e importância da utilização da arabinose	28
2.4.3	A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MP-C5H1	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	OBTENÇÃO DO RESÍDUO	32
3.2	CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE ACEROLA	32
3.2.1	Determinação de extrativos (%)	32
3.2.2	Determinação do teor de celulose e hemicelulose (%)	33
3.2.3	Lignina insolúvel em meio ácido (%) e Cinzas (%)	34
3.2.4	Lignina solúvel em meio ácido (%)	35
3.2.5	Lignina total (%)	35
3.3	HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE ACEROLA PARA OBTENÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	35
3.3.1	Pré-tratamento ácido	35
3.3.2	Caracterização da fração sólida	36
3.3.3	Caracterização da fração líquida	36
3.3.3.1	<i>Açúcares e produtos de degradação</i>	36
3.3.3.2	<i>Compostos fenólicos totais</i>	36
3.3.4	Concentração do hidrolisado hemicelulósico por evaporação	36
3.3.5	Hidrólise enzimática do hidrolisado hemicelulósico	37

3.4	PROPAGAÇÃO DA LEVEDURA E FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	38
3.4.1	Levedura <i>S. cerevisiae</i> MP-C5H1	38
3.4.2	Propagação da levedura em batelada alimentada	38
3.4.3	Análise gravimétrica de crescimento celular e concentração de analitos.....	41
3.4.4	Fermentação em meio sintético	41
3.4.5	Fermentação em batelada do hidrolisado hemicelulósico do resíduo de acerola 43	
3.4.6	Viabilidade celular	45
3.5	CÁLCULOS E ANÁLISE DE DADOS	45
3.5.1	Parâmetros cinéticos de fermentação e propagação.....	45
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE ACEROLA	48
4.2	EFEITO DO TRATAMENTO ÁCIDO NA COMPOSIÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	50
4.3	EVAPORAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELOBIOSE.....	52
4.3.1	Balanco de massa para os açúcares do bagaço de acerola.....	53
4.4	FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	56
4.4.1	Propagação da levedura <i>S. cerevisiae</i> MP-C5H1	56
4.4.2	Avaliação da fermentação usando meio sintético rico em pentoses.....	59
4.4.3	Avaliação da fermentação usando o hidrolisado hemicelulósico obtido do resíduo de acerola	63
4.4.3.1	<i>Análise da viabilidade celular durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de resíduo de acerola</i>	<i>66</i>
4.4.4	Comparação entre as fermentações em meio sintético e hidrolisado hemicelulósico do resíduo de acerola	68
5	CONCLUSÃO.....	73
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	75
	REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

A acerola (*Malpighia emarginata* DC.) é considerada uma superfruta, contendo altos teores de ácido ascórbico e diversos compostos bioativos de interesse farmacêutico como carotenoides, antocianinas e flavonoides. Além da indústria farmacêutica, a acerola vem sendo aproveitada por diversas indústrias multinacionais de todo o mundo para produção de suplementos alimentares (POLETTTO et al., 2021; PRAKASH; BASKARAN, 2018). Entre os resíduos de acerola gerados a partir da indústria de sucos, o que mais chamam atenção são o bagaço, proveniente da etapa de prensagem e a borra, proveniente da etapa de clarificação (ALVES, 2021; BORGES et al., 2021).

A estrutura do bagaço de acerola, bem como dos demais biomassas lignocelulósicas, é composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina (RASHID et al., 2021). Assim como as demais biomassas lignocelulósicas, a estrutura hemicelulósica é constituída por cadeias de polissacarídeos como as xilanas, que possuem em sua estrutura a xilose e as arabinoxilanas que possuem a arabinose. Além da fração hemicelulósica, também se destaca a fração péctica para as frutas, com as cadeias de arabinogalactanas, compostas de açúcares como arabinose e galactose (ANTONISAMY et al., 2023; SEYFRIED et al., 2016). Porém, estes açúcares não estão prontamente disponíveis para serem utilizados, é necessário desconstruir estas cadeias de polissacarídeos através de pré-tratamentos da biomassa, como o tratamento de hidrólise termoquímica para obtenção de hidrolisados hemicelulósicos ricos em pentoses e hexoses (BRETHAUER; STUDER, 2015).

A xilose é um açúcar encontrado em abundância na estrutura das biomassas lignocelulósicas, porém, dentre os açúcares pouco encontrados na natureza, ou se encontrados, em pequenas quantidades, a arabinose chama atenção por ser um açúcar sem valor calórico que possui um potencial a ser utilizado como adoçante (AHMED et al., 2022). A arabinose é o açúcar mais valorizado no mercado mundial. Por causa de seus efeitos benéficos a saúde, a demanda pela indústria farmacêutica e alimentícia está em crescimento e atualmente a arabinose tem um custo de aproximadamente 59 dólares ao quilograma, e em 2010, chegou a ser comercializada a 70 dólares ao quilograma (CHENG et al., 2011; SGANZERLA et al., 2021).

O conceito de biorrefinarias e a utilização de biomassas lignocelulósicas para a obtenção de biocombustíveis, bioenergia e bioprodutos de alto valor, com interesse de superar o uso de produtos derivados de combustíveis fósseis ou produzir produtos de fontes renováveis, como os biocombustíveis (CHERUBINI et al., 2009). Este fato atribuído a origem do resíduo de acerola e a característica de seus constituintes, as pentoses xilose e arabinose. A xilose vem

sendo amplamente explorada como o açúcar foco da indústria de etanol de segunda geração, sendo o seu consumo como fonte de carbono a ser transformado em etanol, o alvo para a maioria das modificações genéticas em leveduras.

O desafio da utilização dos hidrolisados hemicelulósicos em processos fermentativos é constante, pois possuem uma matriz complexa e podem carregar inibidores de enzimas e leveduras, oriundos da hidrólise no pré-tratamento (CHANG; ALASALVAR; SHAHIDI, 2019; PEREIRA et al., 2021). A eficiência da levedura escolhida para este processo é importante, visando o custo efetivo do processo e a total conversão da xilose em produtos valorizados (LIU; HUANG; GENG, 2018). A *Saccharomyces cerevisiae* é o hospedeiro mais comum para importantes modificações genéticas para consumo e fermentação a partir de pentoses como a xilose, sendo considerada uma levedura robusta e resistente a compostos inibidores (LIMA et al., 2019). Produtos de altos valores podem ser obtidos através de fermentações de hidrolisados hemicelulósicos, como biocombustível etanol, o xilitol e a arabinose como adoçantes.

Neste contexto, o presente trabalho teve o interesse de estudar a extração de pentoses a partir do hidrolisado hemicelulósico do resíduo de bagaço de acerola e avaliar o potencial de sua utilização como meio de cultura para fermentação e obtenção de produtos de alto valor agregado utilizando a levedura *S. cerevisiae* recombinante.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o potencial fermentativo da levedura *S. cerevisiae* recombinante usando um hidrolisado hemicelulósico rico em pentoses (xilose e arabinose) obtido sob condições de hidrólise ácida do bagaço de acerola.

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido sulfúrico diluído na extração dos açúcares da cadeia hemicelulósica do bagaço de acerola.
- B) Avaliar a cinética de fermentação de um meio sintético (xilose, arabinose e glicose) com duas diferentes concentrações iniciais de açúcares e se a presença da arabinose tem algum efeito inibitório sobre a levedura.
- C) Avaliar a cinética de fermentação do hidrolisado hemicelulósico obtido do bagaço de acerola em biorreator.

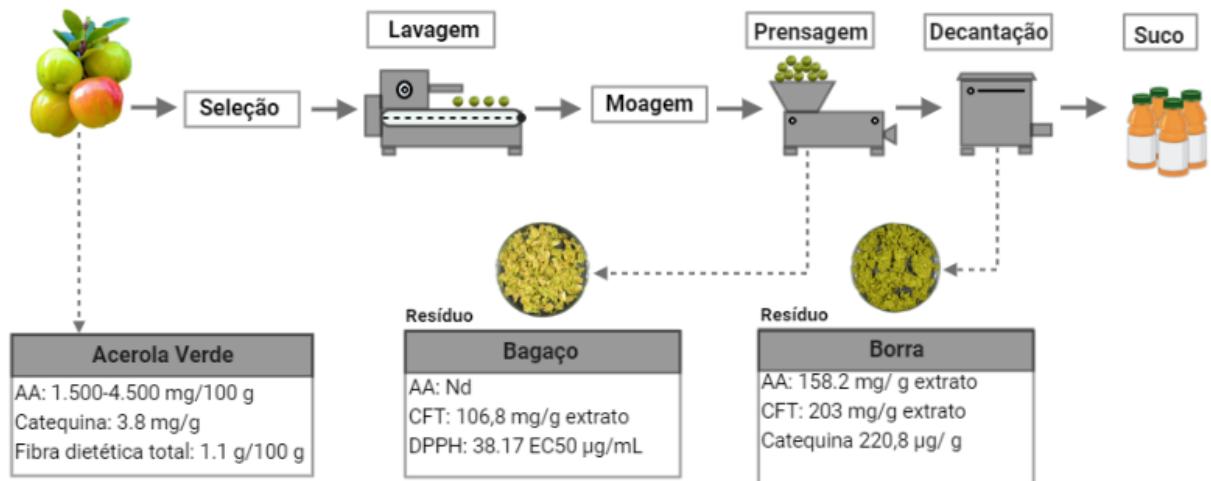
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESÍDUO DE ACEROLA

A acerola (*Malpighia emarginata* DC.) é considerada uma das frutas mais ricas em diversos compostos de interesse farmacêutico, e felizmente o Brasil foi um dos primeiros países a iniciar o seu aproveitamento de forma industrial, possuindo o domínio da exportação. Entretanto um fator muito importante é seu estágio de maturação, sendo a acerola verde o seu mais alto estágio de aproveitamento de compostos bioativos (BELWAL et al., 2018; PRAKASH; BASKARAN, 2018). Contendo altos teores de ácido ascórbico (1500 - 4500 mg/100g), carotenoides, fitonutrientes como flavonoides e antocianinas, a acerola já foi classificada como uma superfruta e já vem sendo utilizada por indústrias multinacionais de todo mundo na produção de suplementos alimentares e nutracêuticos (POLETTTO et al., 2021; PRAKASH; BASKARAN, 2018).

O Brasil produz cerca de 70.000 toneladas de acerola por ano e 40% deste volume é transformado em resíduos, sendo 30% cascas e sementes e 10% restos de polpa de etapas de clarificação de sucos (IBGE, 2017; POLETTTO et al., 2021). Baseado nos processos tradicionais de produção de suco de acerola, dois principais resíduos são formados, o bagaço e a borra. O bagaço é proveniente da etapa de prensagem da fruta e constitui cerca de 20 a 30% do seu peso, e tem um papel importante devido a seu maior volume em relação aos outros tipos de resíduo. A partir do bagaço já foram extraídos açúcares, compostos fenólicos totais entre outros (Figura 1). A borra, é o resíduo proveniente da etapa de decantação do suco e apresenta conteúdo de compostos fenólicos totais, ácido ascórbico, entre outros (Figura 1) (ALVES, 2021; BORGES et al., 2021; SANCHO et al., 2015).

Figura 1 - Esquema geral da produção industrial de suco de acerola e os principais resíduos gerados (bagaço e borra).



Bagaço: resíduos da etapa da prensagem constituído de sementes e cascas; Borra: resíduo da etapa da decantação constituído de restos de polpa; AA: Ácido Ascórbico; CFT: compostos fenólicos totais; DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil. Dados: (POLETTTO et al., 2021; USDA, 2019).

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.1.1 Composição lignocelulósica do bagaço de acerola

Os resíduos, como as cascas e sementes desta superfruta vem sendo explorados como matéria prima para outras aplicações com benefícios a saúde (CHANG; ALASALVAR; SHAHIDI, 2019). Estudos vêm sendo desenvolvidos na caracterização não só de compostos bioativos, mas também no aproveitamento de outras frações da acerola, como as fibras. Valores médios de celulose, hemicelulose e lignina estão descritos na Tabela 1, além de outros componentes, sendo a variação dos resultados atribuída a diferentes métodos de caracterização aplicados. Além das fibras, destaca-se o potencial aproveitamento de açúcares, como a arabinose, a qual já foi quantificada em diferentes estudos com conteúdo de 6,58 g/100g de resíduo Sabino et al., (2020) e 3,96 g/L de arabinose no bagaço de acerola em Alves (2021).

Tabela 1 - Faixas de valores médios de composição físico-química de resíduo de acerola (sementes, cascas e polpa).

Composto	(%)
Cinzas	0,4 - 2,4
Extrativos	14,5 - 14,9
Lignina	20,1 - 28,4
Holocelulose*	44,0 - 44,3
Celulose	24,7 - 43,8
Hemicelulose	17,2 - 19,3
Lipídeos	n.d.
Fibras Totais	83,5 - 28,6
Proteína bruta	8,5 - 11,5

*Holocelulose= celulose + hemicelulose; n.d. – não determinado

Fonte: Adaptado de (CAETANO et al., 2011; CARMO; NAZARENO; RUFINO, 2018; MARQUES et al., 2016; SILVA; DUARTE; BARROZO, 2016)

2.2 DEFINIÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA LIGNOCELULÓSICA

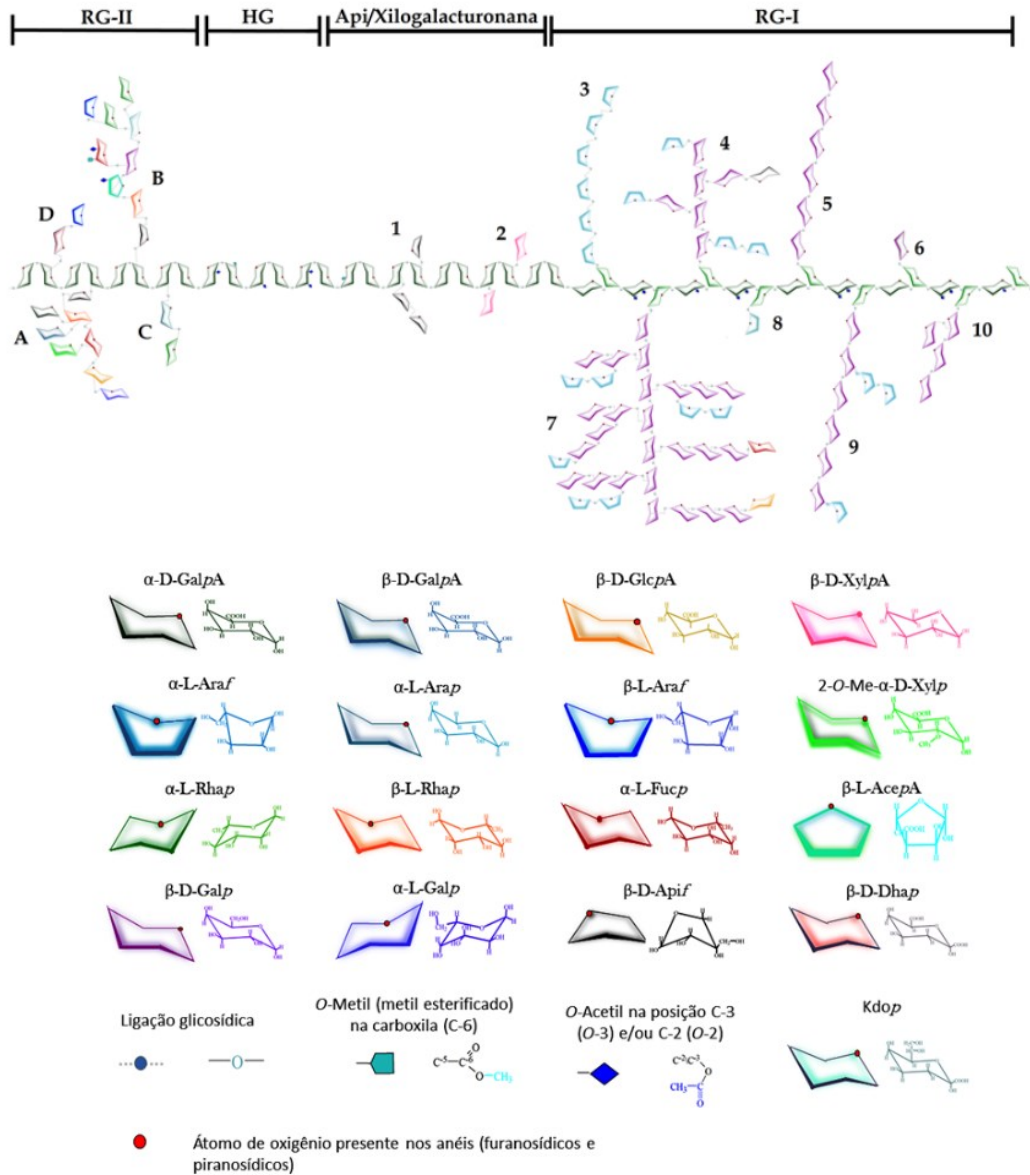
A lignocelulose é um material complexo que constrói a espinha dorsal estrutural de todas as paredes celulares das plantas e é composto principalmente de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polímero de glicose, ligadas por ligações β -1-4 glicosídicas. A lignina é um polímero reticulado anamórfico das três unidades de fenilpropano *sp*-cumaril, álcool de coníferas e sinapílico. A hemicelulose é um heteropolímero de açúcares C5; xilose, arabinose, açúcares C6; manose, glicose, galactose e ácidos urônicos. Geralmente a classificação da hemicelulose é feita através do monossacarídeo mais presente, sendo denominadas de xilanas, arabinoxilanas ou arabinogalactanas, por exemplo (BRETHAUER; STUDER, 2015; SEYFRIED et al., 2016).

A acerola é descrita como uma planta dicotiledônea e esta característica taxonômica, indica diferentes formas de armazenamento de polissacarídeos nas sementes (EMBRAPA, 1996). Segundo Antonisamy et al. (2023), o endosperma de cotilédones de dicotiledôneas tem como principal fontes de reservas de armazenamento, as arabinogalactana e xiloglucanos e nas cascas, a maior fonte de armazenamento de carboidratos provêm da celulose e pectina.

Polissacarídeos constituídos por arabinose e ou galactose são associados a polissacarídeos pécticos, incluindo estruturas de polissacarídeos do tipo arabinanas, galactanas e arabinogalactanas. As arabinogalactanas geralmente são classificadas em arabino-4-galactanas (Tipo I ou AG-I) e arabino-3, 6-galactanas (Tipo II ou AG-II). As estruturas do tipo arabinanas, AG-I e AG-II são frequentemente encontradas ligadas às pectinas ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I), conforme mostra a Figura 2 (SEYFRIED et al., 2016).

No trabalho de Alves (2021) foi realizado a caracterização química do bagaço de acerola, encontrando cerca de 5,5 g/100 g de arabinose quando a etapa de remoção de extrativos não foi aplicada. Realizando a mesma análise com remoção dos extrativos, o conteúdo reduziu para 1,6 g/100 g. Isso indica que a arabinose foi removida nos extrativos durante a etapa de extração com água, comportamento esse que ocorre geralmente com as cadeias de pectinas ainda presentes no bagaço de acerola. O mesmo ocorreu com Sabino et al. (2020), que quantificou arabinose do bagaço de acerola removendo-a com água, e também citou sua natureza pécica a partir das arabinogalactanas.

Figura 2 - Estruturas de pectinas e de polissacarídeos contendo arabinose e ou galactose.



HG:homogalacturonana; RG-I: ramnogalacturonana tipo I; RG-II: ramnogalacturonana tipo II; A (octassacarídeo), B (nonassacarídeo) C e D (dissacarídeos) representam as estruturas presentes em RG-II; 1: β -D-Apif; 2: D-Xylp β ; 3: arabinananas; 4: arabinogalactana tipo I; 5: galactanas; 6: D-Galp; 7: arabinogalactana tipo II; 8: α -L-Araf; 9: arabinogalactana tipo II; 10: galactananas; Kdo: ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico; Dha: ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico.

Fonte: (SEYFRIED et al., 2016).

2.3 METODOLOGIAS PARA ACESSAR AS CADEIAS DE POLISSACARÍDEOS DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS

Quando se trata dos polissacarídeos, sabe-se que eles não estão disponíveis em sua forma natural. É preciso realizar um bom pré-tratamento na biomassa escolhida, para que seja possível extrair a maior quantidade de açúcares possíveis (KUMAR et al., 2020). Comumente, os pré-tratamentos têm como objetivo romper a parede celular e melhorar o acesso aos açúcares. Os ácidos têm o comportamento de liberar açúcares monoméricos com a redução do pH. Os tratamentos alcalinos, geralmente desacetilam ligações éster de carboidratos-lignina, levando a uma extração parcial da lignina. Estes pré-tratamentos facilitam o acesso de enzimas em uma posterior hidrólise enzimática (BRETHAUER; STUDER, 2015).

Os pré-tratamentos comumente mais realizados são os mecânicos, químicos, químico-mecânicos e os biológicos (KUMAR et al., 2020). O trabalho de Khaire; Moholkar; Goyal (2021) cita alguns tratamentos utilizados como a auto hidrólise utilizando dióxido de carbono supercrítico, tratamentos alcalinos, tratamentos ácidos, tratamentos apenas com água e tratamentos físicos como os de explosão a vapor ou aquecimento por micro-ondas. Dentro destas grandes áreas de divisão, observa-se diversos tipos de pré-tratamentos, como os citados por Bedó et al. (2019), os métodos termoquímicos, utilizando a temperatura e reagentes químicos como os ácidos fracos ou diluídos, geralmente resultando em um hidrolisado rico em xilose e arabinose.

Em uma ideia geral, os métodos de pré-tratamentos visam extrair altos rendimentos de açúcar, porém minimizando a degradação dos mesmos, o que pode gerar novos compostos com efeitos inibitórios em processos biológicos como a fermentação. Os inibidores podem ser divididos em três grandes grupos, os ácidos orgânicos de cadeia curta e aldeídos, aldeídos derivados de açúcar e compostos aromáticos (BRETHAUER; STUDER, 2015; SJULANDER; KIKAS, 2020).

2.3.1 Hidrólise ácida

Vários ácidos já foram estudados nos tratamentos de biomassas lignocelulósicas, dentre eles os ácidos fracos, ácidos fortes, ácidos diluídos, ácidos orgânicos e minerais. Dos ácidos minerais, os mais comumente utilizados são o ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido fosfórico (SUN et al., 2016). O tratamento com ácidos diluídos é um dos pré-tratamentos mais promissores, direcionado diretamente a despolimerização da hemicelulose. Ocorre também

certa alteração na lignina tornando-a mais condensada e a celulose fica mais acessível com algumas transformações de descristalinização, modificação nas microfibras e então a formação de monossacarídeos (DU PASQUIER; PAËS; PERRÉ, 2023).

Os procedimentos realizados com ácidos diluídos podem levar a formação de monossacarídeos, oligossacarídeos e compostos de degradação. Dentre os oligossacarídeos podemos observar os mais comuns para biomassas lignocelulósicas, os xilo-oligossacarídeos que são derivados das xilanas da hemicelulose e os celo-oligossacarídeos da celulose. Estas macromoléculas são emergentes e tem sido estudada como prebióticos (VALLADARES-DIESTRA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2022).

A utilização dos açúcares a partir das hidrólises da biomassa podem ser utilizadas para produção de produtos de alto valor agregado através da hidrólise separada da fermentação (SHF) (*separate hydrolysis and fermentation*) (KHAIRE; MOHOLKAR; GOYAL, 2021). A SHF pode ser realizada a partir de hidrólise enzimática e fermentação ou hidrólise termoquímica e em seguida hidrólise enzimática e fermentação. A utilização deste método pode ser empregada para produção de etanol de segunda geração e outros produtos como o xilitol (BEDÓ et al., 2019).

Com o objetivo de extrair a pectina e produzir xilo-oligossacarídeos das cascas de cacau, Valladares-Diestra et al. (2022) utilizaram o tratamento com ácido cítrico em diferentes concentrações e em diferentes temperaturas, em reator com agitação mecânica. O sólido filtrado foi utilizado para uma posterior hidrólise enzimática. O maior rendimento de extração de pectina foi 20,31% com tratamento usando 2,07 % de ácido cítrico a 120 °C por 10 min. Para a recuperação de XOS, os maiores valores foram encontrados em temperaturas acima de 170 °C, de 31,5 a 64,7 mg/g de cascas de cacau, e os arabino-oligossacarídeos apenas em temperaturas acima de 170 °C, cerca de 11 mg/g.

Para a produção de etanol, Saleem et al. (2022) realizou uma hidrólise ácida em cascas de romã e em seguida fermentação alcoólica. O ácido utilizado foi o ácido sulfúrico diluído em uma razão de 1:10 e incubado em *Shaker* de agitação, com diferentes concentrações de ácido e tempo. Os melhores resultados foram através da concentração de 3% de ácido sulfúrico, 75 °C por 19,7 min, onde 150 g/L de carboidratos totais foi alcançado. Destaca-se que nesta concentração a caracterização química do material pré-tratado indicou a menor porcentagem de hemicelulose resultante (14%), a partir de 29% de hemicelulose do material não tratado, ou seja, o maior percentual de extração.

2.3.2 Hidrólise enzimática

Os hidrolisados hemicelulósicos obtidos dos pré-tratamentos de biomassas podem ter quantidades consideráveis de oligossacarídeos, os quais nem sempre são utilizados como substratos por diversos microrganismos. Por este motivo, a hidrólise enzimática do hidrolisado pode ser necessária para aumentar o rendimento dos produtos de fermentação quando o hidrolisado hemicelulósico for utilizado com esse objetivo (VALLADARES-DIESTRA et al., 2022).

Vários parâmetros precisam ser controlados quando se realiza a hidrólise enzimática, como o tipo de substrato, o tempo do pré-tratamento, pH e temperatura, porém têm-se vantagens de custo-benefício e menos agressividade ao meio ambiente. O consórcio entre os microrganismos e entre as enzimas vem sendo utilizado como um fator importante de rendimento de hidrólise devido à complexidade das biomassas lignocelulósicas (WONGFAED et al., 2023).

A hidrólise enzimática consiste na utilização de enzimas para quebrar ligações de cadeias grandes em açúcares. A transformação enzimática consegue despolimerizar a celulose, a hemicelulose produzindo hexoses, pentoses e novas técnicas estão sendo aplicadas na degradação da lignina, para produção compostos fenólicos de alto valor agregado (MENEZES et al., 2023). Explorando as rotas de cinética de despolimerização, um fato conhecido é a presença de inibidores inevitáveis durante a desconstrução da biomassa. Taxas de despolimerização são bastante afetadas pela presença de lignina insolúvel, pelo coquetel de enzimas escolhido, a razão entre substrato e enzima, e sua afinidade. Outra possível inibição pode ocorrer pelos próprios açúcares produzidos, principalmente a glicose e a xilose (BAKSI et al., 2023).

Para a desconstrução das células da parede celular de plantas em geral, geralmente emprega-se as enzimas celulasas e hemicelulasas. Geralmente as enzimas são empregadas como misturas ou coquetéis que normalmente atingem sítios ativos diferentes e/ou são sinérgicas entre si. Dentre as celulasas podem ser empregadas enzimas como endo-exo glucanases e β -glicosidasases capazes de fracionar celo-oligossacarídeos e celobiose. Outras enzimas empregadas são as pectinases e laccases (BAKSI et al., 2023; BRETHAUER; STUDER, 2015).

Algumas enzimas mais específicas produzidas foram citadas no trabalho de Kurakake et al. (2011), onde foi estudado a obtenção de L-arabinose através do crescimento em meio de cultura com a bactéria *Arthrobacter aureescens* MK5 usando arabinoxilanas extraídas de cascas

de milho como substrato. Este microrganismo foi capaz de produzir enzimas como as arabinofuranohidrolase e arabinofuranosidase, hidrolisando a arabinoxilana e liberando somente L-arabinose. Este trabalho também apresentou a utilização de β -xilosidase e β -xilanasas que não tiveram um bom efeito nas arabinoxilanas.

2.4 FERMENTAÇÃO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

A *Saccharomyces cerevisiae* é o hospedeiro mais utilizado em todo mundo para construir leveduras geneticamente modificadas para o consumo de xilose. Apesar de ser naturalmente incapaz de captar e consumir xilose do meio de cultura, atualmente ferramentas ôhmicas estão sendo utilizadas para dirigir modificações genéticas bem-sucedidas. A levedura apresenta elevados títulos em etanol, tolerância a altas concentrações de etanol e a açúcares, e é considerada uma levedura robusta inclusive para competir contra inibidores e contaminantes em processos fermentativos (LIMA et al., 2019).

O objetivo da Engenharia Metabólica é usar ferramentas genéticas para modificar as rotas metabólicas, para a produção de produtos específicos como os aminoácidos e para a utilização ou degradação de substratos alternativos como as pentoses da hemicelulose de plantas (LIU, 2013). O foco das modificações genéticas da *S. cerevisiae* para consumo de pentoses como a xilose e arabinose, está na indústria de etanol de segunda geração para aproveitamento da conversão de hexoses e pentoses liberadas em pré-tratamentos e hidrólises enzimáticas de materiais lignocelulósicos (LIMA et al., 2019).

Em estudo recente, descreve-se que ainda há muitas melhorias e estudos a serem realizados em cepas de *S. cerevisiae* modificadas por engenharia genética para o consumo de xilose. Por exemplo, a utilização da xilose continua lenta em relação a da glicose pela levedura, que afeta a velocidade de formação do produto, e consequentemente a produtividade de etanol (NARAYANAN; SANDSTRÖM; GORWA-GRAUSLUND, 2023).

Apesar de alguns fungos e leveduras serem capazes de utilizar a arabinose como fonte de carbono e de energia, não são capazes de utilizá-la para fermentação. Algumas cepas de leveduras *S. cerevisiae* já foram modificadas geneticamente para conseguir metabolizar a arabinose, sempre com o intuito de melhorar a produção de etanol através da conversão de todos os açúcares presentes na biomassa utilizadas como matéria-prima de fermentações (OEHLING et al., 2018; WISSELINK et al., 2007).

Tendo em vista que a arabinose é um açúcar de alto valor agregado em todo mundo pelas tendências de utilização na indústria farmacêutica e alimentícia. A produção comercial da arabinose consiste basicamente em vários métodos rebuscados como cromatografias de separação, colunas de troca iônica e utilização de enzimas específicas (endo- e exo-arabinases), os quais elevam muito os custos. O valor de custo por quilograma de arabinose, em 2010 chegou a ser mais de 70 dólares ao quilo. Por este motivo, alguns trabalhos já começaram a explorar a pesquisa da biopurificação da arabinose através de processos biotecnológicos como a

fermentação, com intuito de ser um processo mais simples e aproveitar os resíduos de indústrias como a de cana de açúcar, de espigas de milho entre outros (CHENG et al., 2011).

2.4.1 Arabinose presente no hidrolisado hemicelulósico

A arabinose é um açúcar importante que constitui o resíduo de acerola. A levedura usada neste trabalho não tem a capacidade de utilizar este açúcar como substrato e como previsto não foi consumida em nenhuma das fermentações, em meio sintético ou no hidrolisado hemicelulósico. No final da fermentação, além da arabinose, há a presença de outros compostos como o etanol, xilitol e glicerol. Além disso, apresenta açúcares residuais quando o hidrolisado hemicelulósico foi usado como meio de cultivo. Devido à presença desses compostos a separação da arabinose pode ser onerosa. A arabinose possui um papel importante na área da saúde e vem sendo estudada como ingrediente funcional de alimentos e na área farmacêutica (POL; PUHLMANN; MARS, 2022). Como se torna um açúcar residual em fermentações nas quais a levedura não é capaz de consumi-la, como no caso deste trabalho, uma das opções seria sua separação do hidrolisado hemicelulósico e aproveitamento.

Alguns trabalhos publicados já apresentaram resultados para a purificação da L-arabinose através do uso de leveduras. No trabalho de Park et al. (2001), foi utilizado a levedura *Williopsis saturnus var. saturnus* para efetivo consumo de D-xilose da arabinóxilana extraída de fibras de milho, em um tempo de 72 h, restando apenas a L-arabinose no meio. A arabinose foi separada das células por centrifugação, seguida de descolorização com carvão ativado e purificação por passagem em coluna de resinas de troca catiônica e aniônica. Após estas etapas, a solução foi concentrada por evaporação e submetida a cristalização para obtenção de pequenos cristais de L-arabinose com a utilização de uma solução de etanol e temperatura controlada. No processo foi obtido 21,9 g de L-arabinose, com uma perda de 7 g.

Outro trabalho utilizando a biopurificação da arabinose através de leveduras foi feito por Cheng et al. (2011). Após uma seleção de 30 cepas de diversas leveduras, *Pichia anomala* Y161 foi selecionada como fermentadora de xilose e não fermentadora de arabinose em um meio de cultura sintético. A partir de 8 L de fermentação rico em xilose, um rendimento de 103,1 g de arabinose foram recuperados e 45 g perdidos no processo, e utilizou etapas semelhantes a Park et al. (2001), com carvão ativado, filtração, coluna de resinas de troca iônica, temperatura e solução de etanol para obter a purificação dos menores cristais.

No trabalho de Bedó et al. (2019) foi utilizado o farelo de trigo como matéria prima. Após hidrólise ácida utilizando ácido sulfúrico, foi obtido um hidrolisado hemicelulósico rico

em xilose e arabinose. Este hidrolisado hemicelulósico foi fermentado com a levedura *Ogataea zsoletii* com objetivo de produzir xilitol e purificar a arabinose no mesmo experimento somente pela fermentação. A levedura consumiu todos os açúcares e não houve produção de álcoois. Foi alcançado uma pureza de até 93,8% de arabinose.

Assim como Fehér et al. (2015), que realizou a biopurificação da arabinose somente com a fermentação utilizando a levedura *Candida boidinii* em um hidrolisado hemicelulósico de resíduos industriais de fibras de milho hidrolisado com ácido sulfúrico, alcançou 90% de pureza, porém não conseguindo realizar a etapa de cristalização por não ter consumido o açúcar galactose.

2.4.2 Perspectivas e importância da utilização da arabinose

O conteúdo de açúcares disponíveis nos alimentos tem ficado cada vez maior e associado ao sedentarismo se torna um problema, pois, as pessoas consomem mais carboidratos, proteínas e gorduras e se exercitam cada vez menos. Substâncias alternativas ao açúcar convencional vêm sendo estudadas nas últimas décadas, sendo sintéticas ou naturais, mas que devem ter um gosto semelhante a sacarose. Outros aspectos que devem possuir são as propriedades não tóxicas, não cancerígenas e sem efeitos na glicose sanguínea ou insulina (BELTRAMI; DÖRING; LINDNER, 2018).

Existe cerca de 40 tipos de açúcares raros descritos na literatura, classificados desta forma por estarem presentes em pequenas quantidades em frutas, vegetais, grãos e mel. Alguns efeitos benéficos a saúde estão sendo estudados através destes açúcares, incluindo a arabinose. A arabinose (L-arabinose), é um açúcar sem valor calórico, com um sabor muito similar a sacarose, possuindo apenas metade da doçura da sacarose e vem sendo estudado como adoçante (AHMED et al., 2022)

A empresa Betawell[®] já possui a aprovação de geralmente reconhecido como seguro (GRAS), para o ingrediente Betawell[®] Arabinose, proveniente da polpa de beterraba. O uso proposto de Betawell[®] Arabinose é como aditivo em alimentos e bebidas para população em geral como fonte de carboidrato em substituição parcial da sacarose em 2 a 30%, ou como substituição completa de outros sistemas edulcorantes como mistura de arabinose/sacarose com uma composição de arabinose de 2-30% (FDA, 2018). Alguns estudos demonstram atividades benéficas a saúde pela arabinose, como observa-se na Tabela 8.

Baseado nas evidências benéficas à saúde relacionadas ao consumo de arabinose é válido destacar que estudos para avaliar a viabilidade econômica da recuperação da arabinose

são válidos para valorização desse resíduo. Além disso, conforme Sganzerla et al. (2021), a arabinose é um dos açúcares de maior valor no mercado mundial, tendo um custo de 59 dólares/kg, seguido da galactose 21 dólares/kg.

Figura 2 - Atividades benéficas a saúde pela utilização de L-Arabinose.

Método	Teste	Melhores resultados	Referências
Eficácia da L-Arabinose na Redução das Respostas Glicêmicas e Insulinêmicas: O Efeito Modificador do Amido e da Gordura	Controle: 50 g de sacarose em água - Gordura: controle + 22 g óleo - Amido: controle + 50 g de amido; e todos os três com e sem a adição de 5 g de L-arabinose.	A adição de L-arabinose à bebida controle reduziu os picos de glicose e insulina em 15% e 52%; para a bebida gordurosa em 8% e 45%; e para a bebida amilácea em 7% e 29%. Reduziu significativamente as respostas glicêmicas e insulinêmicas pós-prandiais em indivíduos saudáveis. Teste clínico com análise sanguínea foi realizado após ingerir as bebidas:	(POL; PUHLMANN; MARS, 2022)
L-arabinose e D-xilose: pentoses doces que podem reduzir as respostas pós-prandiais de glicose e insulina	No experimento A, foram testadas três bebidas: (1) L-arabinose, (2) D-xilose e (3) bebida controle. No experimento B, foram testados dois muffins: (1) L-arabinose e (2) muffin controle. Todos os produtos consistiam em aproximadamente 50 g de carboidratos disponíveis, e L-arabinose ou D-xilose foi adicionado como 10% de sacarose.	Os picos de glicose e insulina foram menores após a bebida L-arabinose e D-xilose do que a bebida controle (P <0,01). Após o consumo do muffin, as respostas de glicose não foram significativamente diferentes. Teste clínico com análise sanguínea foi realizado após ingerir as bebidas e o muffin.	(POL; MARS, 2021)
Efeitos protetores da L-arabinose na síndrome metabólica induzida por dieta rica em carboidratos e gorduras em ratos	Foram testados os níveis de expressão de genes relacionados a ácidos graxos, em ratos com dieta alta em carboidratos por 6 semanas. Foi analisado também aspectos físicos e fisiológicos dos ratos.	Após o tratamento com L-arabinose, os ratos tiveram uma redução no peso corporal, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, glicemia de jejum, triglicerídeos, colesterol total, insulina sérica e respostas inflamatórias. Um estudo posterior mostrou que o tratamento com L-arabinose aumentou significativamente a expressão para enzimas de oxidação de ácidos graxos e oxidação de glicose, mas a expressão do gene de síntese de ácidos graxos foi reduzida.	(HAO et al., 2015)
Efeito protetor de arabinose e polpa de beterraba contra o estresse oxidativo induzido por alta glicose em células LLC-PK1	Os efeitos protetores da L-arabinose e da polpa de beterraba sacarina (SBP) no estresse oxidativo induzido por glicose alta foram investigados usando células LLC-PK1	A arabinose exibiu atividades inibitórias mais fortes no estresse oxidativo induzido por glicose alta do que o SBP. Esses achados indicam que a L-arabinose e o SBP são agentes antioxidantes promissores com atividades protetoras contra a hiperglicemia	(SONG et al., 2012)

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.4.3 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* MP-C5H1

A construção da cepa MP-C5H1 é derivada de outras duas linhagens geneticamente modificadas da *S. cerevisiae*. Primeiramente, foi utilizada a cepa industrial de *S. cerevisiae* CAT-1. A CAT-1 é uma linhagem diplóide para produção de etanol e foi isolada em uma planta de produção industrial de etanol (usina VO Catanduva, São Paulo/ SP) em 1998/1999. Esta cepa foi escolhida entre diversas linhagens industriais pelo seu desempenho em crescimento em xilulose, e foi transformada com os genes de metabolização de xilose (BASSO et al., 2008; GONÇALVES, 2014).

A MP-C5, se trata de uma linhagem geneticamente igual a CAT-1 (isogênica), porém com modificação utilizando a técnica de construção de plasmídeos, o AUR1::pAUR-XKXDHXR que possui sequências que codificam para o promotor e terminador da enzima fosfofrutocinase (PFK) para a sobre-expressão dos genes XYL1(XR) e XYL2(XDH) de *S. stiptis*, e sobre-expressão do gene XKS1(XK) de *S. cerevisiae*. Sendo XYL1 (codificando para xilose redutase) e XYL2 (codificando para xilitol desidrogenase) de *S.stiptis* e XKS como auxiliar no desempenho para produção de etanol a partir de xilose. Este plasmídeo possui a habilidade de integrar-se cromossomicamente no locus AUR1 de *S. cerevisiae*. Por último, a linhagem MP-C5H1, isogênica a MP-C5, foi modificada para super expressar a forma truncada do transportador HXT1 (transportador de hexoses como a glicose), sem os primeiros 56 aminoácidos da proteína, conferindo estabilidade na membrana (GONÇALVES, 2014; PEREIRA et al., 2021). Por fim, obteve-se a cepa MP-C5H1, capaz de utilizar a glicose e a xilose como fonte de carbono e para fermentação alcoólica. Os produtos de fermentação produzidos pela cepa MP-C5H1, durante a co-fermentação de xilose e glicose, foram o etanol, xilitol e glicerol. Estes produtos foram obtidos através de estudos para a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos de cana-de-açúcar por Pereira et al. (2021).

As duas linhagens MP-C5 e MP-C5H1, foram desenvolvidas pelos ex-alunos de Doutorado Davi Ludvig Gonçalves e Ângela A. dos Santos, do Departamento de Bioquímica da UFSC sob orientação do Prof. Dr. Boris U. Stambuk.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO RESÍDUO

O bagaço de acerola seco (BA), (*Malpighia emarginata* DC.), constituído por sementes e pele, foi gentilmente cedido por uma indústria processadora de acerola localizada no município de Ubajara-CE. O lote de amostra foi recebido no ano de 2022. A indústria utiliza o fruto imaturo devido ao alto conteúdo de vitamina C para produzir extratos concentrados. O bagaço foi moído em moinho de facas (1,5 a 2 mm), tipo Willey (DeLeo, Porto Alegre, Brasil) e armazenado em local escuro, seco e arejado até sua utilização.

Figura 3 - Bagaço seco de acerola constituído de sementes e peles.



Fonte: Elaborado pelo autor

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE ACEROLA

A caracterização química realizada neste estudo é baseada em metodologias de caracterização de bagaço e palha de cana-de-açúcar (CNPEN, 2019). O procedimento visa facilitar a identificação dos componentes através da fragmentação da biomassa em partes menores. Esta caracterização determina a porcentagem de extrativos, celulose, hemicelulose, lignina solúvel e insolúvel, lignina total e cinzas insolúveis em meio ácido, através dos cálculos analíticos descritos a seguir. As análises foram realizadas para o bagaço antes e após o pré-tratamento ácido.

3.2.1 Determinação de extrativos (%)

A caracterização do BA iniciou-se com a etapa de remoção de extrativos utilizando um cartucho de extração confeccionado com papel filtro e cerca de 1,5 a 2,0 g de biomassa em base

seca moída. Utilizou-se um extrator do tipo Soxhlet e adicionou-se 400 mL de solução de ciclohexano-etanol na proporção 1:1, onde sob aquecimento realizou-se ciclos até completar 8 h. Após esta primeira etapa, a solução foi substituída por água permanecendo por mais 24 h em ciclos.

Após completado o procedimento no extrator, filtrou-se o conteúdo para a obtenção da biomassa livre de extrativos usando um cadinho de fundo poroso e com o auxílio de membrana de fibra de vidro, previamente tarados e secos em estufa a 105 °C por 24 h. O cálculo de percentagem de extrativos é apresentado pela Equação 1 (Eq. 1) abaixo:

$$E(\%) = \left(\frac{MBSM - MBE}{MBSM} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo:

E: O teor de extrativos da biomassa expresso em %; MBSM: massa de biomassa seca e moída (g); M: massa de biomassa livre de extrativos (base seca) (g).

3.2.2 Determinação do teor de celulose e hemicelulose (%)

Primeiramente realizou-se a pesagem de 0,3 g da biomassa em base seca e livre de extrativos, com granulometria < 1 mm, em tubos específicos para hidrólise ácida. Adicionou-se cuidadosamente 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) ao tubo de hidrólise, onde aqueceu-se a 30 °C em banho termostático por 60 min, agitando o conteúdo a cada 10 min com um bastão de vidro. Adicionou-se 84 mL de água destilada, fechou-se os tubos de forma firme e autoclavou-se por 60 min a 121 °C. Resfriou-se os frascos até temperatura ambiente e filtrou-se o conteúdo à vácuo em um cadinho de fundo poroso com membrana de fibra de vidro previamente tarados, e recolheu-se a fração líquida em um kitassato e reservou-se o volume para análise de lignina solúvel, carboidratos, ácido acético e outros produtos de degradação. O cadinho foi direcionado a uma estufa de secagem, onde secou-se por 24 h a 105 °C.

Do conteúdo reservado da filtração, realizou-se as análises de determinação da concentração em g/L dos analitos que constituem os carboidratos estruturais através da Cromatografia Líquida de Alta Precisão (CLAE). Para os analitos glicose, celobiose, arabinose, xilose, ácido acético e ácido fórmico, utilizou-se o equipamento Shimadzu Prominence LC-20A (Shimadzu, Tóquio, Japão) com uma coluna Bio-rad® Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) e detector de índice de refração (IR) RID-20A. A injeção de 10 µL da amostra foi eluída com 5 mmol/L de H₂SO₄ em uma vazão de 0,6 mL/min. A temperatura do forno foi mantida a 35 °C e o tempo de execução foi de 30 min.

Para complementar a caracterização, analisou-se 5-hidroximetilfurfural e furfural em outro equipamento CLAE, com detector de matriz de diodos (DAD). Os compostos foram separados a 30 °C com Nova-Pak C18 (4 um, Waters) usando acetonitrila/água (1:8 com 1% de ácido acético) como fase móvel a uma taxa de 0,8 mL/min.

Para obtenção das porcentagens, utilizou-se os cálculos abaixo conforme as Equações 2 e 3:

$$\text{Cel (\%)} = \left[\frac{((0,90 \times C_{gli}) + (0,95 \times C_{celo}) + (1,29 \times CHMF) + (3,53 \times C_{\acute{a}c.F\acute{o}rm}) * V)}{MBE} \right] \times \left[1 - \left(\frac{E}{100} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Hemi (\%)} = \left[\frac{((0,88 \times C_{xil}) + (0,88 \times C_{ara}) + (0,72 \times C_{\acute{a}c.Ac\acute{e}t}) + (1,37 \times C_{Fur})) * V}{MBE} \right] \times \left[1 - \left(\frac{E}{100} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo:

Cel (%) o teor de celulose da biomassa expresso em %; CGli a concentração de glicose expressa em g/L; CCelo a concentração de celobiose expressa em g/L; CHMF a concentração de HMF expressa em g/L; C_{Ác.Fórm} a concentração de ácido fórmico expressa em g/L; Hemi (%) o teor de hemicelulose expresso em %. C Xil é a concentração de xilose expressa em g/L; Carab a concentração de arabinose expressa em g/L; C_{Ác. Acét} a concentração de ácido acético expressa em g/L; CFUR é a concentração de furfural expressa em g/L; V o volume final (L) da filtração e MBE a massa de biomassa livre de extrativos (bs) (g).

3.2.3 Lignina insolúvel em meio ácido (%) e Cinzas (%)

Os cadinhos com o conteúdo retido na filtração da etapa anterior, já secos, são pesados para obtenção dos dados necessários para determinar o conteúdo de lignina insolúvel, como mostra a Equação 4. A seguir, foram encaminhados para a mufla e calcinados a 575 °C, onde permaneceu por 180 min. Após desligar a mufla e a mesma atingir temperatura de 105 °C, armazenou-se os cadinhos no dessecador, e em seguida realizou-se a pesagem para determinação de conteúdo de cinzas, como descrito na Equação 5.

$$LI(\%) = \left[\frac{MCpR - (M_{cinzas} + MCp)}{MBE} \right] \times \left[1 - \frac{E}{100} \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

$$M_{cinzas} (g) = M_{cpc} - M_{cp} \quad (\text{Eq. 5})$$

Sendo:

LI: teor de lignina insolúvel em %; MCpR : Massa do cadinho de placa porosa com os resíduos sólidos (g); M_{cinzas} : Massa de cinzas insolúveis em meio ácido (g); MCp: Massa do

cadinho de placa porosa (g): MBE: Massa de biomassa livre de extrativos (bs) (g) e E: teor de extrativos (%). MCPc : Massa do cadinho de placa porosa (g) com as cinzas.

3.2.4 Lignina solúvel em meio ácido (%)

Determinou-se o conteúdo de lignina presente no líquido filtrado da etapa anterior (3.2.2), utilizando 8,5 mL do mesmo e 1,5 mL de NaOH 6,5 mol/L para ajuste do seu pH para aproximadamente 12-12,5. Diluiu-se a amostra por cerca de 10x e realizou-se a leitura da absorbância na faixa de 280 nm no espectrofotômetro UV-vis (Hitachi, modelo U-2900, Japão), com absorbância entre 0,2 e 0,8. Antes da leitura das amostras, realizou-se a leitura de um branco conforme descrito na metodologia. O conteúdo de lignina solúvel foi calculado de acordo com a Equação 6.

$$Ls(\%) = \left[\frac{CLS \times V}{MBE} \right] \times \left[1 - \left(\frac{E}{100} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

LS (%) é o teor de lignina solúvel, expresso em porcentagem massa por massa (% m/m); CLS é a concentração de lignina solúvel, expressa em g/L; V é o volume final da filtração, expresso em L; MBE é a massa de biomassa livre de extrativos (base seca em gramas); E é o teor de extrativos totais, expresso em porcentagem massa por massa (% m/m).

3.2.5 Lignina total (%)

O valor de lignina total é a soma dos teores de lignina insolúvel e solúvel conforme a Equação 7.

$$LT(\%) = LI(\%) + Ls(\%) \quad (\text{Eq. 7})$$

3.3 HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE ACEROLA PARA OBTENÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

3.3.1 Pré-tratamento ácido

Com base nas extrações de Monteiro et al. (2019), usando semente de açaí, os resíduos de acerola foram submetidos ao pré-tratamento com ácido sulfúrico (H₂SO₄) diluído para a extração da fração polissacarídica hemicelulósica.

Utilizou-se as concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5% de H₂SO₄, que serão representados neste trabalho respectivamente por tratamentos A, B e C. Para isto, adicionou-se 50 mL da solução ácida em 5 g de resíduo em base seca em frascos de vidro de 250 mL resultando em

uma razão sólido:líquido de 1:10. Para uma melhor absorção da solução ácida pelo resíduo seco, os frascos permaneceram em repouso por cerca de 15 min. Autoclavou-se os frascos a 121 °C por 30 min. Em seguida, já resfriados, filtrou-se o conteúdo em papel filtro previamente tarado.

3.3.2 Caracterização da fração sólida

A fração sólida recuperada em papel filtro foi lavada com água destilada quente até sua neutralização e submetida a secagem em estufa de ar quente a 105 °C por 24 h e armazenada para caracterização química lignocelulósica (item 3.1).

3.3.3 Caracterização da fração líquida

3.3.3.1 Açúcares e produtos de degradação

A fração líquida recuperada foi submetida a caracterização de açúcares e produtos de degradação por CLAE (xilose, arabinose, glicose, ácido acético e ácido fórmico, HMF e furfural), como já descrito anteriormente no item 3.1.4.

3.3.3.2 Compostos fenólicos totais

Realizou-se a quantificação de compostos fenólicos totais com base na análise colorimétrica utilizando o reagente Folin-Ciocalteu segundo a metodologia de (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

Em microplacas de 96 poços, adicionou-se aos poços 15 µL dos hidrolisados dos pré-tratamentos (diluídos quando necessário) em 240 µL de água destilada e 15 µL de Folin-Ciocalteu (0,2 M). Em seguida, adicionou-se 30 µL de Na₂CO₃ 20%, onde, na ausência de luz, a reação permaneceu por 1 h. As microplacas foram levadas ao equipamento leitor de microplacas (Multileader Infinite M200 TECAN, ZH, Switzerland) com absorbância de 765 nm. Nas microplacas, foram dispostos nos poços, a curva padrão com ácido gálico para comparar com as leituras de absorbâncias dos hidrolisados. As absorbâncias foram obtidas através do *software*, em um computador acoplado ao equipamento.

3.3.4 Concentração do hidrolisado hemicelulósico por evaporação

Com o intuito de obter um hidrolisado hemicelulósico concentrado e em quantidade suficiente para a realização de ensaio de fermentação, realizou-se um novo pré-tratamento ácido, em aumento de escala. Hidrolisou-se 640 g de resíduo seco em 6,4 L de solução ácida,

nas mesmas condições do item anterior (3.2.1). Para isso, 180 g de resíduo foram adicionados em 1,8 L de solução de ácido diluído em um frasco de capacidade de 2 L, permitindo a sobre de um *headspace*. Este procedimento foi repetido por 2 vezes. Para completar as 640 g, foi realizado 2 hidrólises em frascos de 2 L, contendo 140 g de resíduos e 1,4 L de solução ácida diluída.

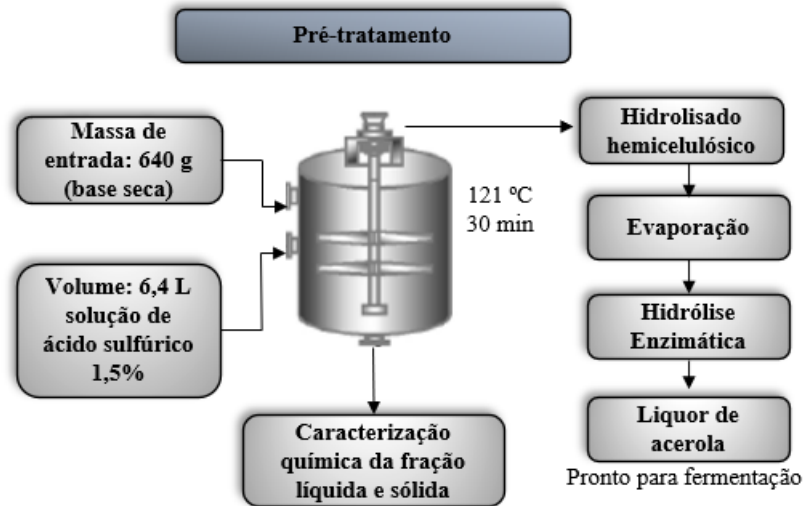
O hidrolisado hemicelulósico foi evaporado à vácuo em equipamento Rotaevaporador (Fisatom, modelo 801, SP, Brazil), até a redução do volume inicial (5 L) em aproximadamente 5x. O hidrolisado foi armazenado sob resfriamento em frasco de vidro para posterior utilização.

3.3.5 Hidrólise enzimática do hidrolisado hemicelulósico

Realizou-se a hidrólise enzimática do hidrolisado hemicelulósico concentrado visando hidrolisar a celobiose e aumentar a concentração total de açúcares. A escolha dos parâmetros (pH 5, 50 °C e 6% - g enzima/g celulose) utilizados na hidrólise foram baseados na ficha técnica do coquetel enzimático Cellic[®] CTec2 (NOVOZYMES, 2010). Seguindo a metodologia descrita por NREL (2008^a), a atividade enzimática do coquetel foi determinada e encontrou-se o valor de 92.5 FPU/mL (unidades de papel filtro).

Inicialmente, corrigiu-se o pH do hidrolisado concentrado (pH = 0,2) com NaOH em pérolas, até alcançar o pH ideal para atividade da enzima escolhida (pH = 5). Destaca-se nesta etapa, a possível variação do conteúdo de açúcares obtidos inicialmente, podendo haver diluição do hidrolisado hemicelulósico. Em um frasco de vidro de 1 L contendo o hidrolisado hemicelulósico concentrado, com volume final de 450 mL utilizou-se a concentração 6% m/m (cerca de 4,0 FPU/g celobiose, ou 0,44 g enzima) em 450 mL do coquetel enzimático. Utilizou-se a concentração enzimática em relação a celobiose por se tratar de um líquido hidrolisado e não mais de um material sólido (celulose). Conduziu-se a reação em equipamento *Shaker* (Tecnal TE-424), em uma agitação de 150 rpm por 3 h a 50 °C. A nova concentração de açúcares foi determinada através da CLAE. A Figura 4 mostra um resumo das análises de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica de acerola.

Figura 4 - Resumo das análises de pré-tratamento



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 PROPAGAÇÃO DA LEVEDURA E FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

3.4.1 Levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1

A cepa gentilmente cedida pelo departamento de Bioquímica da UFSC pelo Professor Dr. Boris Stambuk foi mantida em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. O armazenamento ocorreu em criotubos contendo meio YPDX (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1% dextrose e 1% xilose, em m/v) e glicerol 50 % (1:1) conforme realizado e descrito por Pereira, (2020). A levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1, conforme detalhado no item (2.4.3), possui a modificação genética para consumo e fermentação da xilose.

3.4.2 Propagação da levedura em batelada alimentada

Anteriormente a propagação da levedura em biorreator, foram realizadas as etapas de pré-inóculo e inóculo detalhados no Quadro 1, em incubadora *Shaker* (Nova Ética Incubadora, 430), sob agitação de 150 rpm a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O pré-inóculo foi realizado inicialmente através da reativação de um criotubo retirado do freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3.4.1) foi realizado um repique em placas contendo YPDX ágar (adição de 1,5% ágar) para reativação (estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h) e posterior inoculação de uma alçada da placa nos frascos Erlenmeyer contendo 0,25 L de meio de cultura (Quadro 1). A transferência

de células do pré-inóculo para o inóculo foi realizada utilizando 10% do volume total desejado para o inóculo (0,5 L), de forma asséptica.

Quadro 1 - Meios de cultura utilizados nas etapas de pré-inóculo e inóculo em *shaker* e propagação da levedura em biorreator.

Etapa	Meio de cultura (g/L)	Tempo (h)	Volume (L)
Pré-inóculo	20 glicose; 10 extrato de levedura; 20 peptona	12	0,25
^a Inóculo	20 glicose; 10 extrato de levedura; 20 peptona; 2,4 ureia; 1 MgSO ₄ .7H ₂ O	24	0,50
^a Propagação	30 glicose; 3 extrato de levedura; 5 peptona; 2,4 ureia; 1 MgSO ₄ .7H ₂ O; 2 KH ₂ PO ₄	24	2,8
^b Pulso	2,4 ureia; 2 KH ₂ PO ₄	0,66	0,12
^c Alimentação	127 glicose; 3 extrato de levedura;	16	1,50

^a Volume: volume total de meio de cultura, sendo 10% deste volume, o volume do inóculo. ^b Pulso realizado anteriormente a etapa de alimentação, aproximadamente 5 min. ^c início após a propagação completar 8 h.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A propagação foi realizada em biorreator (New Brunswick BioFlo 110) de 5 L, com um volume inicial de 2,8 L, incluindo o uso de 10% do inóculo. O procedimento de propagação se dá inicialmente em batelada, e após 8 h inicia-se a fase de batelada alimentada, a qual teve duração de 16 h, até o término da propagação. O pulso foi inserido no biorreator através de bomba peristáltica de forma rápida “pulso” anteriormente a alimentação, cerca de 5 min. A alimentação foi realizada no biorreator através de bomba peristáltica a 1,56 mL/min e composição já descrita no Quadro 1.

O biorreator (Figura 5) foi operado a 30 °C, sem controle de pH, com aeração inicial de 0,1 volume de ar por volume de meio por minuto (vvm) e ajustes de controle de agitação e no

volume de ar, para que a concentração de oxigênio dissolvido permanecesse superior a 50% em relação à saturação do ar atmosférico (cerca de 700 a 900 rpm, conforme a demanda). A dorna de fermentação, juntamente com todos os aparatos de montagem, foi previamente esterilizada em autoclave a 121 °C, por 20 min. Todos os parâmetros e metodologia da etapa de propagação foram baseados no trabalho de (PEREIRA, 2020).

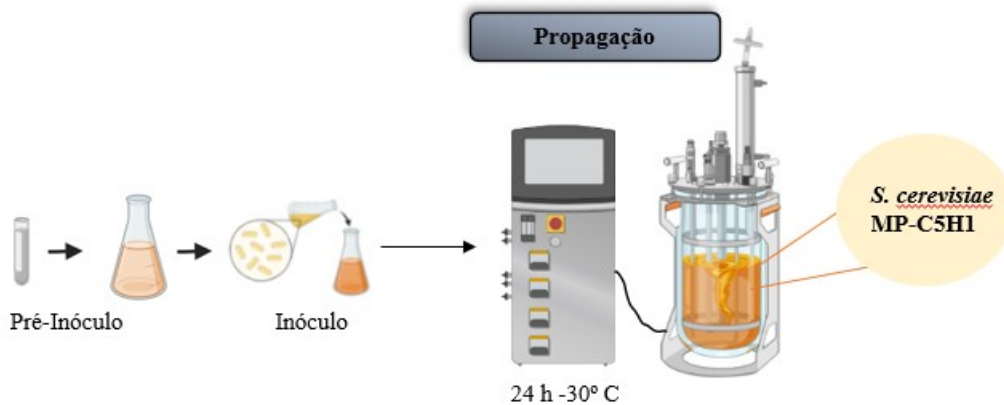
Após o término da propagação, a biomassa com alta densidade celular foi retirada da dorna de fermentação, centrifugada (Eppendorf, 5804R), ressuspendida e lavada em água destilada estéril, e em seguida despejada em um frasco de vidro estéril de 1 L. O frasco com concentração de 166,8 g/L de células foi armazenado em temperatura de 4 °C para posterior uso na fermentação. Todas as etapas da propagação estão resumidas na Figura 6.

Figura 5 - Biorreator New Brunswick BioFlo 110 de 5 L, durante a realização da propagação.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6 - Etapas da propagação da levedura.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.3 Análise gravimétrica de crescimento celular e concentração de analitos

Alíquotas foram coletadas a cada 4 h durante todo processo e analisadas para obtenção dos valores do crescimento celular em massa seca. O volume de 1 mL foi coletado em duplicata diretamente de uma seringa acoplada ao biorreator e em seguida distribuído em microtubo de 1,5 mL previamente seco e pesado. Após, os microtubos foram centrifugados a 10.000 rpm em centrífuga (HsiangTai, CN2160). O sobrenadante recolhido deste processo foi congelado e armazenado até futura análise em CLAE, para obtenção da concentração de analitos presentes sendo eles, glicose, glicerol e etanol como mencionado no item 3.1.4 e a uma temperatura de 50 °C. O conteúdo precipitado foi lavado com água destilada, ressuspenso e em seguida centrifugado novamente. O novo conteúdo sobrenadante foi descartado e o microtubo com o precipitado foi levado à estufa a 105 °C por 24 h, resfriado em dessecador e pesado em balança analítica (Sartorius, PRACTUM224-10BR).

3.4.4 Fermentação em meio sintético

Duas fermentações foram realizadas em meio sintético contendo glicose, xilose e arabinose, sendo realizadas em triplicata, simultaneamente em *Shaker* (Nova Ética Incubadora, 430), sob agitação de 220 rpm a 30 °C por um período total de 72 h. As fermentações foram realizadas em frascos tipo Erlenmeyer de 0,5 L, com volume de trabalho de 0,2 L. Os frascos foram tampados com algodão hidrófobo, coberto com papel kraft. Todos os frascos e meios de cultura foram previamente esterilizados a 121 °C por 20 min.

A fermentação (A) foi realizada simulando concentrações totais aproximada de açúcares obtidos no hidrolisado hemicelulósico concentrado do resíduo de acerola, e a fermentação (B) foi realizada com aproximadamente o dobro da concentração de açúcares obtida no hidrolisado hemicelulósico concentrado. A concentração inicial de levedura utilizada foi 10 g/L, previamente preparadas na etapa de propagação (3.4.2). No quadro 2, foi detalhado a composição dos meios sintéticos utilizados.

Quadro 2 - Meios de cultura utilizados na etapa de fermentação dos meios sintéticos em *Shaker*.

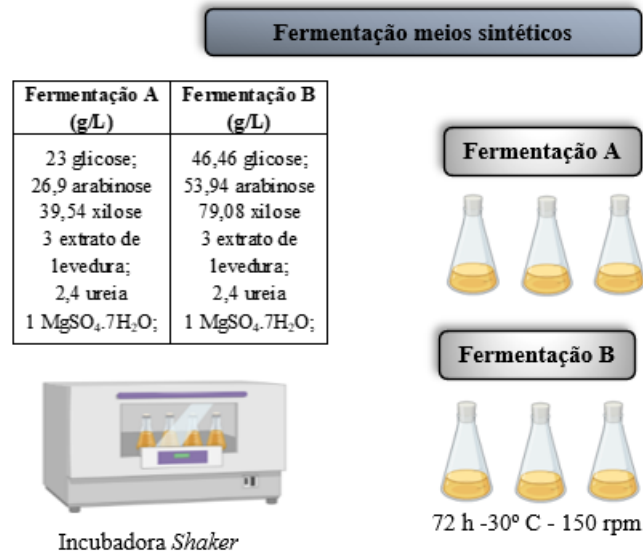
Etapa	Meio de cultura (g/L)	Tempo (h)	Volume (L)
Fermentação A	23 glicose; 27 arabinose 40 xilose 3 extrato de levedura; 2,4 ureia 1 MgSO ₄ .7H ₂ O;	72	0,20
Fermentação B	46 glicose; 54 arabinose 80 xilose 3 extrato de levedura; 2,4 ureia 1 MgSO ₄ .7H ₂ O;	72	0,20

Fonte: Elaborado pelo autor

Durante a fermentação, o volume de 1 mL foi coletado através de micropipetas de forma asséptica em capela de fluxo laminar e em seguida distribuídos em microtubos de 1,5 mL previamente seco e pesado. Após os microtubos foram centrifugados a 10.000 rpm em centrífuga (HsiangTai, CN2160). O sobrenadante recolhido deste processo foi congelado e armazenado até futura análise em CLAE, para obtenção da concentração de analitos presentes sendo eles, glicose, xilose, arabinose, etanol, glicerol, xilitol e ácido acético.

O conteúdo precipitado foi lavado com água destilada, ressuspenso e em seguida centrifugado novamente. O novo conteúdo sobrenadante foi descartado e o microtubo com o precipitado foi levado a estufa a 105 °C por 24 h, resfriados em dessecador e pesados em balança analítica (Sartorius, PRACTUM224-10BR), para acompanhamento de da concentração celular durante a fermentação. Na Figura 7 observa-se o esquema de fermentação em meio sintético.

Figura 7 - Fermentações nos meios sintéticos A e B.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.5 Fermentação em batelada do hidrolisado hemicelulósico do resíduo de acerola

A fermentação foi realizada em duplicata em dois biorreatores (New Brunswick BioFlo 115) de 1,5 L (Figura 8), simultaneamente, previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min. O volume de trabalho utilizado de 0,5 L, foi composto por 0,45 L de hidrolisado hemicelulósico do resíduo de acerola preparado conforme descrito no item 3.3 (3.3.1 a 3.3.5). O hidrolisado hemicelulósico foi suplementado em capela de fluxo laminar de forma asséptica com todos os componentes estéreis, com 2,4 g/L de ureia (previamente esterilizada via filtração por membrana 0,22 µm), 1 g/L de MgSO₄.7H₂O. Foi utilizado uma concentração celular inicial de alta densidade de 10 g/L (ou 29 g da biomassa obtida na etapa de propagação) de levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 e o volume foi completado com água destilada estéril até 0,5 L. Após o preparo do hidrolisado hemicelulósico, houve a inserção deste meio no biorreator através de bomba peristáltica. Os biorreatores foram operados em uma temperatura de 30 °C a 150 rpm, sem controle de pH, por um período total de 72 h.

Alíquotas de 2,5 mL foram retiradas a cada 3 h durante as 24 h iniciais da fermentação, e a cada 6 h até completar 72 h, para análise gravimétrica de crescimento celular (item 3.4.3) e determinação da concentração dos analitos (celobiose, glicose, xilose, arabinose, glicerol, xilitol, etanol, ácido acético e ácido fórmico) por CLAE. Após o término de todo processo fermentativo, o hidrolisado hemicelulósico fermentado foi retirado das dornas de fermentação dos biorreatores e centrifugado em centrífuga (Eppendorf, 5804R) a 5000 rpm por 10 min. Após

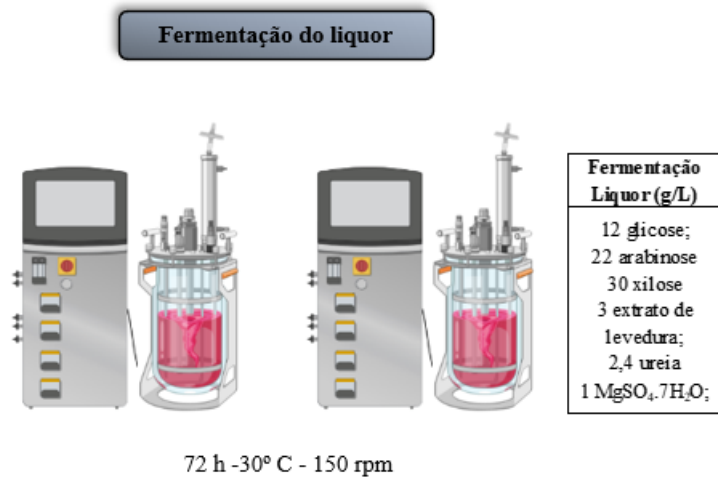
centrifugado, o sobrenadante foi armazenado sob congelamento. Observa-se um esquema da fermentação do hidrolisado hemicelulósico na Figura 9.

Figura 8 - Biorreator New Brunswick BioFlo 115 de 1,5 L alimentado com o hidrolisado hemicelulósico do resíduo de acerola durante o processo fermentativo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Fermentação do hidrolisado hemicelulósico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.6 Viabilidade celular

Em uma câmara de Neubauer, as análises de viabilidade celular foram realizadas como descrito em Norris; Et Ribbons, 1969) seguindo a metodologia de coloração com azul de metileno. A análise foi realizada nos pontos: 0, 3, 12, 21, 36, 48, 60 e 72 h. A solução foi propriamente diluída (0,025%) e em seguida a suspensão de células e corante foram misturados em uma proporção 1:1. A nova solução foi despejada delicadamente na superfície da câmara de Neubauer com lamínula e foi realizada a contagem. Na contagem das células, considerou-se como células vivas aquelas sem coloração e as células mortas coradas em azul, em microscópio trinocular (Olympus, CX21FS1).

3.5 CÁLCULOS E ANÁLISE DE DADOS

3.5.1 Parâmetros cinéticos de fermentação e propagação

Os cálculos realizados para análise de dados das cinéticas de fermentação e propagação foram descritos através das equações no Quadro 3, com base nos cálculos e ajustes descritos por Liu (2013) e Schmidell et al. (2001).

Quadro 3 - Parâmetros cinéticos usados para avaliação das etapas de propagação e fermentação.

Descrição	Equação	Unidade	Número
Fator de conversão de substrato em produto	$Y_{p/s} = \frac{Pf - Pi}{Si - Sf}$	g _p /g _s	(Eq. 8)
Fator de conversão de substrato em células	$Y_{x/s} = \frac{Xf - Xi}{Si - Sf}$	g _x /g _s	(Eq. 9)
Rendimento	$\eta = \frac{Y_{p/s}}{Y_{p/s}Est} * 100$	%	(Eq. 10)
Produtividade volumétrica global	$Q_p = \frac{Pf - Pi}{t}$	g/L/h	(Eq. 11)
*velocidade específica de crescimento	$\mu_x = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt}$	h ⁻¹	(Eq. 12)
**Velocidade específica máxima de crescimento	$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu_x max * t$	h ⁻¹	(Eq. 13)
*Velocidade específica de formação de produto	$\mu_p = \frac{1}{X} * \frac{dP}{dt}$	g _p /g _x /h	(Eq. 14)
*Velocidade específica de consumo de substrato	$\mu_s = \frac{1}{X} * \frac{-dS}{dt}$	g _s /g _x /h	(Eq. 16)

Pi= produto inicial; Pf= Produto final; Si= substrato inicial; Sf= substrato final; t=tempo; X= massa de levedura; dX/dt= derivada da biomassa/derivada do tempo; dP/dt= derivada do produto/derivada do tempo; dS/dt=derivada do substrato/derivada do tempo; Est= 0,511 (fator de conversão estequiométrico de substrato em produto).

*calculado com ajuste sigmoidal de Boltzmann. **Calculado com ajuste linear.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados deste trabalho, utilizou-se o *software* Statistica® 10.0. Através do *software*, realizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, bem

como as médias e desvio padrão (\pm), a um nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE ACEROLA

A Tabela 2 mostra a composição química do bagaço de acerola antes e após os pré-tratamentos ácidos com H₂SO₄ diluído A (0,5%), B (1,0%) e C (1,5%). Os valores são apresentados em porcentagem mássica em base seca.

Tabela 2 - Caracterização química do bagaço de acerola e sólido insolúvel recuperado dos pré-tratamentos.

% componente	BA	A	B	C
Celulose	22,5 ± 0,2 ^a	29,7 ± 1,7 ^d	23,5 ± 1,5 ^b	24,5 ± 0,5 ^c
Hemicelulose	8,8 ± 0,2 ^c	1,7 ± 0,4 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
<i>Xilose</i>	6,5 ± 0,2 ^c	1,7 ± 0,4 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
<i>Arabinose</i>	0,7 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
<i>Ácido Acético</i>	0,7 ± 0,1 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
<i>Furfural</i>	0,6 ± 0,1 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
Lignina Total	28,0 ± 0,4 ^b	39,50 ± 0,6 ^c	43,6 ± 0,0 ^a	43,6 ± 0,5 ^a
<i>Lignina Insolúvel</i>	21,3 ± 0,2 ^b	36,12 ± 0,4 ^c	39,8 ± 0,0 ^a	39,7 ± 0,8 ^a
<i>Lignina Solúvel</i>	6,7 ± 0,1 ^b	3,52 ± 0,1 ^a	3,7 ± 0,0 ^a	3,8 ± 0,2 ^a
Extrativos	28,0 ± 0,5 ^b	4,8 ± 0,1 ^a	4,4 ± 0,1 ^a	4,7 ± 0,0 ^a
Cinzas	-	-	-	-
Total	87,4 ± 0,4 ^d	75,9 ± 3,0 ^c	71,5 ± 1,3 ^a	72,9 ± 1,0 ^b

BA: bagaço de acerola; A: 0,5% de H₂SO₄; B: 1,0% de H₂SO₄; C: 1,5% de H₂SO₄. Médias com a mesma letra na mesma linha não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (p ≤ 0, 05)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores da composição química encontrados para o bagaço de acerola, celulose 22,5%, hemicelulose 8,8%, lignina total 28%, extrativos 28% e cinzas 0% (Tabela 2) diferem dos resultados encontrados na literatura, para as principais *commodities* lignocelulósicas. A cana-de-açúcar, palha de arroz, espigas de milho, madeiras duras e macias, por exemplo, que apresentam uma faixa de 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e de 10-25% de lignina (RASHID et al., 2021). Diferentemente das *commodities* citadas, o bagaço de acerola é oriundo de uma fruta, o que pode ocasionar nesta diferença de composição.

Valores encontrados por Mesquita (2018), em um estudo da composição da fração fibrosa de diversas frutas, mostraram que a casca e as sementes de acerola apresentaram valores de 32,07% para celulose semelhante às *commodities* citadas acima. Porém, os autores encontraram 8,94% de hemicelulose e 22,04% de lignina de forma semelhante a este estudo, o que pode ser atribuído pelo tipo de amostra coletada e sazonalidade.

No trabalho de Alves (2021), o conteúdo de hemicelulose presente no bagaço de acerola foi quantificado usando metodologia similar a este estudo. É importante destacar que a autora usou bagaço de acerola proveniente do mesmo fornecedor, porém de um lote mais antigo (2020). O conteúdo de hemicelulose encontrado foi de 12,6%, em que 8,9% era xilose e 1,6% era arabinose. A caracterização também foi realizada sem executar a etapa de remoção dos extrativos, onde verificou-se uma perda de açúcares (xilose e arabinose) durante essa etapa, já que o conteúdo desses açúcares considerados como hemicelulósicos foi de 18,7%. No trabalho desenvolvido por Ioannidou et al. (2022), citou-se a diferença entre resultados de caracterização química, comparando resíduos de engaço de uvas, com e sem a remoção de extrativos. Os resultados demonstraram perdas de açúcares como celobiose, glicose, arabinose, manose e glico-oligossacarídeos transferidos para a água na etapa de remoção de extrativos, reduzindo o teor de celulose e hemicelulose. Neste trabalho, a caracterização foi realizada apenas com a etapa de remoção de extrativos conforme descreve a metodologia usada.

Após o tratamento ácido (A, B e C), o conteúdo de hemicelulose foi verificado apenas no sólido recuperado do tratamento mais brando (A-0,5% H₂SO₄). Houve a redução do conteúdo de hemicelulose de 8,84% no bagaço de acerola para apenas 1,7% no tratamento A, sendo estatisticamente diferente. Nos pré-tratamentos B e C o conteúdo de hemicelulose não foi detectado nos sólidos recuperados, indicando que houve total solubilização desta em forma de analitos de xilose, arabinose e ácido acético no hidrolisado hemicelulósico (Tabela 2).

Segundo Valladares-Diestra et al. (2022) a fração hemicelulósica e a dos extrativos é a mais suscetível a solubilização durante o pré-tratamento ácido. Como observado na tabela, o conteúdo de extrativos reduziu de 28% para aproximadamente 4,8% nos tratamentos A, B e C. Já o aumento da porcentagem de lignina observado nas frações sólidas acontece devido a solubilização de conteúdo celulósico, hemicelulósico e de extrativos, o que justifica o aumento significativo do conteúdo de lignina total observado neste trabalho, pois a lignina não é característica de grandes solubilizações em meio ácido.

Como observado na Tabela 2, a composição química do bagaço de acerola apresentou teor de celulose de 22,5%, sendo significativamente menor que os tratamentos A, B e C. Entre os tratamentos, o tratamento A apresentou valores significativamente maiores de celulose (29,7%), seguidos dos tratamentos B (23,5) e C (24,5), que apresentaram menores resultados. Como a hemicelulose é solubilizada pelo tratamento ácido, e a celulose e lignina solubilizadas apenas parcialmente, a tendência é sempre de aumento do conteúdo de celulose e lignina na fração do sólido insolúvel recuperado após os pré-tratamentos ácidos.

4.2 EFEITO DO TRATAMENTO ÁCIDO NA COMPOSIÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

O tratamento ácido é um dos métodos mais utilizados para uma extração direcionada aos açúcares obtidos da hemicelulose, para solubilizá-los em seu máximo e deixá-los disponíveis para futuras etapas (KUMAR et al., 2020). No presente trabalho, a hidrólise ácida foi realizada para obtenção principal do conteúdo de xilose e arabinose, provenientes da hemicelulose e pectina.

Os açúcares quantificados foram a celobiose, glicose, xilose, arabinose e outros analitos como o ácido acético e compostos fenólicos totais, conforme Tabela 4. No hidrolisado recolhido do pré-tratamento ácido, houve uma maior concentração de açúcares recuperados no hidrolisado conforme o aumento da concentração do ácido. Neste trabalho não foi possível realizar a quantificação da galactose, devido ao tipo de coluna cromatográfica utilizada (HPX-87H) não separar a xilose da galactose em meio ácido.

Os tratamentos demonstrados na Tabela 3 foram descritos em etapas. O tratamento A, B e C são respectivamente 0,5, 1,0 e 1,5% de H₂SO₄. O tratamento D se refere ao hidrolisado C em aumento de escala, seguido pelo tratamento E (hidrolisado concentrado) e, por último, o tratamento F, referindo-se ao hidrolisado após a hidrólise enzimática (Etapas descritas no item 3.3).

Tabela 3 - Concentração de analitos presente nos hidrolisados obtidos nos pré-tratamentos com ácido diluído, após concentração por evaporação e após hidrólise enzimática.

Tratamento	Celo (g/L)	Gli (g/L)	Xil (g/L)	Ara (g/L)	Ác. Acét. (g/L)	CFT (g/L)
A	2,0 ± 0,06 ^c	0,5 ± 0,18 ^a	4,4 ± 0,10 ^b	5,2 ± 0,13 ^a	0,7 ± 0,01 ^b	0,4 ± 0,00 ^a
B	3,5 ± 0,08 ^{ab}	1,0 ± 0,03 ^{ab}	7,8 ± 0,17 ^a	5,2 ± 0,12 ^a	1,2 ± 0,03 ^a	0,4 ± 0,01 ^a
C	3,9 ± 0,37 ^b	1,3 ± 0,12 ^b	8,9 ± 0,87 ^a	5,4 ± 0,48 ^a	1,3 ± 0,15 ^a	0,5 ± 0,00 ^a
D*	3,2 ± 0,07 ^a	1,1 ± 0,03 ^{ab}	7,6 ± 0,15 ^a	5,6 ± 0,17 ^a	1,4 ± 0,01 ^a	-
E**	17,9 ± 0,43 ^c	5,9 ± 0,27 ^c	40,3 ± 1,94 ^d	27,5 ± 1,46 ^c	2,1 ± 0,23 ^c	2,8 ± 0,08 ^b
F***	6,1 ± 0,09 ^d	12,4 ± 0,44 ^d	29,3 ± 0,8 ^c	23,0 ± 1,44 ^b	2,5 ± 0,11 ^d	-

A: 0,5% de H₂SO₄; B: 1,0 de H₂SO₄; C: 1,5% de H₂SO₄; *D: hidrolisado C na etapa de aumento de escala; **E: Hidrolisado D concentrado; ***F: Hidrolisado E após hidrólise enzimática; Celo: celobiose, Gli: glicose, Xil: xilose, Ara: arabinose, Ác. Acét.: ácido acético, CFT: compostos fenólicos totais. Médias com a mesma letra na mesma linha não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (p ≤ 0, 05).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Da mesma forma que para Monteiro et al. (2019), a aplicação de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em sementes de açaí, mostrou aumento da disponibilidade de açúcares

na fase líquida devido à quebra das cadeias dos açúcares estruturais durante o pré-tratamento, paralelo ao aumento do fator de severidade da hidrólise ácida.

A xilose também é destacada como um açúcar solúvel da hemicelulose suscetível a degradação, e neste trabalho, podemos observar que a xilose é o açúcar com maior concentração no hidrolisado B, C e D, que também possuem maior concentração de ácido acético (BRETHAUER; STUDER, 2015). Observou-se no tratamento A, menores concentrações com diferença significativa na presença de celobiose, glicose, xilose e ácido acético, apenas não havendo diferença para arabinose.

A Tabela 3 mostra que o efeito do pré-tratamento ácido C (1,5% H₂SO₄) resultou em maior extração de açúcares com 5,4 g/L de arabinose e a presença de cerca de 8,9 g/L de xilose. No estudo de Sabino et al. (2020) foi encontrado 3,3 g/L de arabinose e não foi detectado presença de xilose da semente e polpa de acerola através da extração de açúcares apenas com água ultrapura a 90 °C por 10 h e 5% de resíduo.

Na extração de arabinose e xilose realizado por Bedó et al. (2019), foi utilizado tratamento com ácido sulfúrico (1,16 % m/m) em resíduo de farelo de trigo, atingindo 8,3 g/L de arabinose e 10,9 g/L de xilose no hidrolisado hemicelulósico. Percebe-se a atuação efetiva do tratamento ácido na extração de açúcares da fração pectica e hemicelulósica de diferentes biomassas.

No trabalho de Antonisamy et al. (2023), foi realizado uma revisão bibliográfica da composição química de açúcares e monossacarídeos presentes em diversos resíduos de frutas, onde os açúcares como glicose, manose, galactose, xilose, arabinose e ramnose foram reportados diversas vezes para composição de sementes de frutas. Outro exemplo citado foi a presença de açúcares como ramnose, arabinose, galactose, glicose e xilose para *Sterculia lychnophora* Hance, que se trata da semente de uma árvore medicinal. A presença específica de açúcares como ramnose, arabinose, galactose e ácidos urônicos indicam polissacarídeos provenientes da pectina.

No trabalho de Alves (2021), foi realizado a pesquisa de ácidos urônicos em bagaço de acerola e foi encontrado no pré-tratamento com ácido sulfúrico a 2,5%, a presença de 5,43 g/L de ácido galacturônico, sugerindo que a arabinose encontrada naquele trabalho, poderia pertencer a fração pectica do bagaço de acerola.

Dos tratamentos realizados, foi ainda observado que não só a concentração de açúcares aumentou conforme aumentaram as concentrações de ácido sulfúrico, mas também a concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico dos tratamentos B e C (1,24 e 1,38 g/L) foram maiores que do tratamento A (0,74 g/L) comparando apenas os tratamentos antes

da concentração. Após a concentração, o hidrolisado C concentrado, apresentou resultado maior (2,13 g/L) do que os tratamentos A, B e C.

O ácido acético é um produto de degradação da hemicelulose citado na revisão bibliográfica de Brethauer; Studer (2015), que destaca os efeitos não desejados dos pré-tratamentos, com a geração de compostos inibidores tanto para enzimas quanto para microrganismos usados em fermentação. Além do ácido acético, pode ocorrer a formação de ácido fórmico, HMF e furfural, sendo os três últimos não detectados em nenhum dos hidrolisados hemicelulósicos. Os compostos fenólicos totais são produtos da degradação parcial da lignina que são liberados durante o pré-tratamento, os quais também podem ter efeito inibitório em altas concentrações.

4.3 EVAPORAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELOBIOSE

Dos tratamentos realizados, utilizou-se o tratamento C (1,5% H₂SO₄) como forma de obtenção do hidrolisado hemicelulósico a ser usado na etapa de fermentação. Para isso, volume de 6,4 L foi produzido seguido de evaporação para atender a concentração de açúcares necessária na etapa de fermentação em duplicata em biorreatores com volume mínimo de trabalho de 0,5 L.

Na Tabela 3 são encontradas as concentrações dos açúcares medidos no volume total obtido (6,4 L), mencionado como tratamento D – aumento de escala. Somado a isso, também foi realizado uma etapa de concentração deste novo hidrolisado hemicelulósico através da evaporação, com o intuito de aumentar a concentração total de açúcares inicial para uma fermentação efetiva. A evaporação também foi utilizada como método de reduzir inibidores voláteis que poderiam afetar a eficiência da levedura. Vale destacar que o volume foi reduzido em aproximadamente 5 vezes resultando na concentração de todos os analitos presentes no hidrolisado que não são volatilizados na temperatura e pressão utilizada. Levando em consideração as estimativas de valores finais, considerando uma concentração de aproximadamente 5 vezes, todos os açúcares mostraram uma concentração final condizente com essa estimativa (observado na tabela 4, tratamento E). Na fração condensada recolhida do processo de evaporação, foi encontrado o valor de 1,07 g/L de ácido acético indicando que parte deste analito foi evaporado, restando apenas 2,1 g/L no hidrolisado hemicelulósico concentrado. O procedimento de evaporação obteve efeitos em relação a concentração de

compostos fenólicos totais presentes no hidrolisado E, pois, o valor inicial do hidrolisado D foi concentrado e apresentou diferença significativa (Tabela 3).

No trabalho de Ping et al. (2013) foram citados sobre alguns métodos de detoxificação que são amplamente utilizados para reduzir os inibidores de hidrolisados hemicelulósicos, contudo, muitos acabam reduzindo a quantidade de açúcares totais disponíveis, através de perdas nestes processos, como o uso do carvão ativado, por exemplo. Por estes motivos, a evaporação foi o único método utilizado para redução de inibidores.

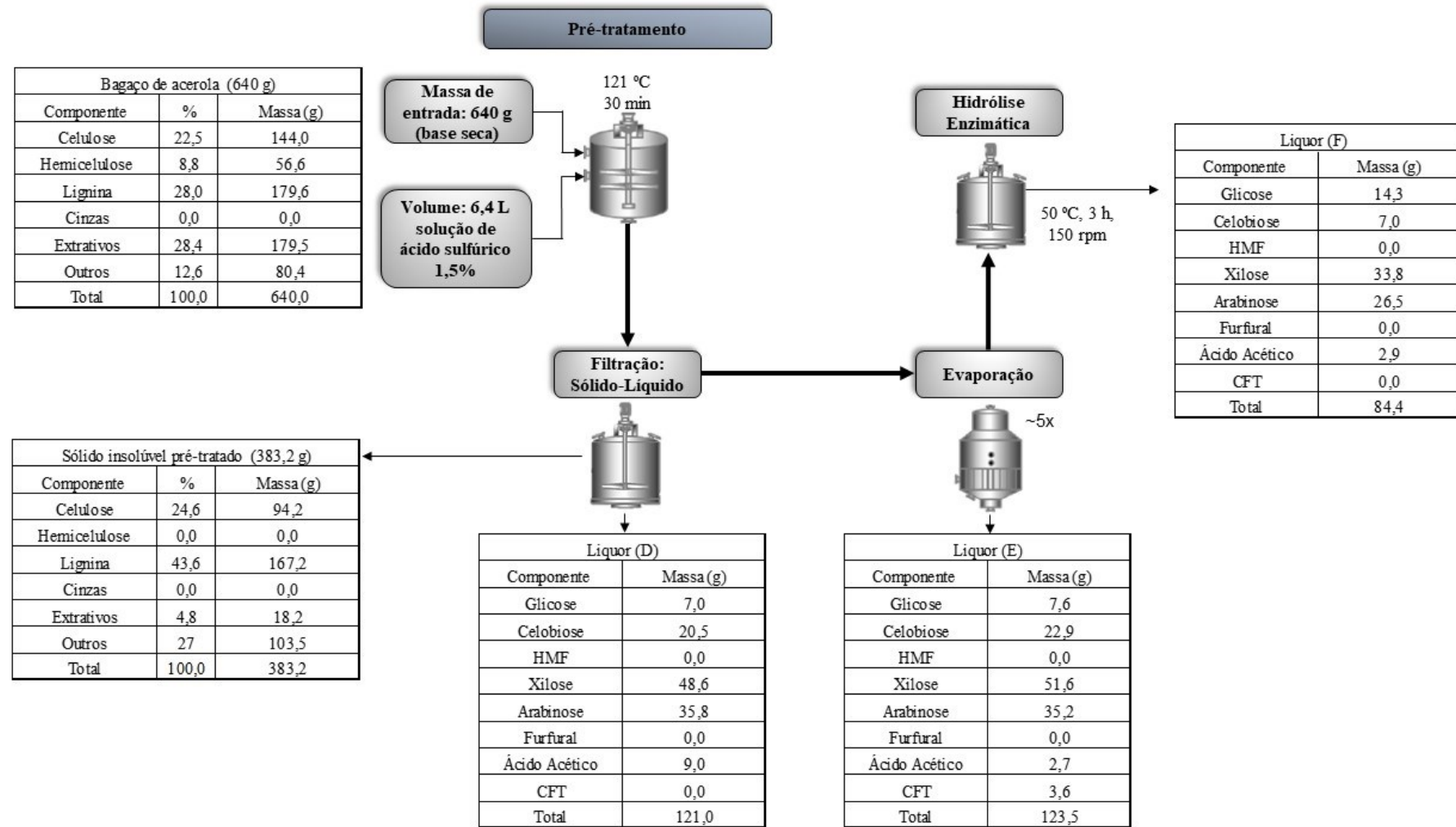
Na hidrólise enzimática, um complexo de celulases (β -glucosidases-hemicelulases) foi utilizado para degradar a celobiose em glicose. No hidrolisado E (concentrado), foi obtido 17,9 g/L de celobiose e após o tratamento enzimático o resultado obtido foi de 6,12 g/L de celobiose (hidrolisado F). É possível observar que o tratamento enzimático teve atuação sobre o conteúdo de celobiose presente no meio causando sua redução. Paralelo a isto, houve um aumento da concentração de glicose de 5,9 para 12,4 g/L, sendo esta glicose adquirida da quebra da celobiose, porém a hidrólise não foi completa já que restaram 6,1 g/L de celobiose no meio.

Na pesquisa de Sjulander; Kikas (2020), foi citado que a atividade dos compostos fenólicos pode levar a inibição de enzimas, como a desativação e precipitação de celulases por ácido tânico e a inibição de β -glicosidades por vanilina e siringaldeído. Como observado na Tabela 4, houve perdas no conteúdo de glicose, xilose e arabinose após a hidrólise enzimática quando comparando ao hidrolisado E (após a evaporação). Infelizmente, não foi possível observar as causas da perda de açúcares.

4.3.1 Balanço de massa para os açúcares do bagaço de acerola

Com os resultados obtidos das análises de caracterização química do bagaço de acerola e dos demais tratamentos realizados no hidrolisado C, o qual foi escolhido para a seguinte etapa de fermentação, foi realizado um balanço de massa do processo, considerando um valor inicial de 640 g, devido a etapa de aumento de escala. A Figura 10 apresenta o balanço de massa de todas as etapas prévias a fermentação.

Figura 10 - Balanço de massa das etapas de caracterização, hidrólise ácida, aumento de escala e hidrólise enzimática.



CFT: compostos fenólicos totais; HMF: 5-hidroximetilfurfural

Fonte: Elaborado pelo autor.

O balanço mostra que de 640 g iniciais na etapa de caracterização, 383,2 g foram recuperados como sólido insolúvel pré-tratado e deste sólido, 94,2 g eram celulose, 0,0 g para hemicelulose e 167,2 g de lignina. Estas quantidades em massa, são menores que as do bagaço de acerola, que também apresentava massa para hemicelulose (56,6 g).

Ao somarmos os açúcares constituintes da celulose, do hidrolisado e do sólido insolúvel, podemos observar que houve uma pequena perda de massa no conteúdo de celulose. Ao observarmos a recuperação de açúcares constituintes da hemicelulose, há diferenças. No sólido insolúvel caracterizado recuperou-se 119,78% de xilose e 611,54% de arabinose, ambos extrapolando os 100%. Como já mencionado anteriormente, o principal responsável pelos resultados de recuperação no hidrolisado maiores que os iniciais detectados na caracterização do bagaço de acerola, é a etapa de remoção de extrativos do bagaço de acerola, conduzindo a uma perda de açúcares e gerando extrapolação do resultado no balanço.

Também é importante destacar que o balanço de massa da caracterização do bagaço de acerola inicial não atingiu 100%. Tal comportamento também foi obtido por Ioannidou et al. (2022), que realizou a caracterização de resíduos da uva e entre seis caracterizações diferentes, cinco apresentaram o total entre 80 e 90% com a remoção de extrativos. Sugere-se uma perda analítica, pois, a metodologia utilizada foi semelhante e/ou igual a usada neste trabalho. Portanto, sugere-se que a metodologia de CNPEM (2019) e NREL (2008b), não apresentam os resultados desejados para resíduos de frutos, por se tratar de metodologias baseadas em palha e bagaço de cana-de-açúcar.

Na etapa de aumento de evaporação, é possível visualizarmos que a massa não variou, apenas houve perdas na massa de ácido acético de 9 g para 2,7 g. A evaporação poderia ser considerada tanto uma etapa de concentração como de detoxificação do hidrolisado.

O líquido concentrado foi submetido a uma hidrólise enzimática com o intuito aumentar o conteúdo de glicose, que de fato ocorreu, partindo de um valor de 7,6 g para 14,3 g. A recuperação dos açúcares no hidrolisado F em relação ao hidrolisado E foram, para glicose 188%, pelo ganho de massa após a celobiose ser convertida em glicose e 30% para celobiose que perdeu massa após hidrólise enzimática. Houve o aproveitamento de 65% da xilose e 75,3% de arabinose. Apesar do aumento de glicose, ocorreram perdas no conteúdo de xilose e arabinose e a causa desta perda não foi detectada.

4.4 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

Nesta etapa os resultados da fermentação do hidrolisado hemicelulósico são apresentados. Inicialmente, a etapa de propagação da levedura, uma etapa importante no processo de fermentação, foi discutida. Em seguida, a análise cinética da fermentação da levedura em meio hemicelulósico sintético e no hidrolisado obtido do resíduo de acerola são apresentadas.

4.4.1 Propagação da levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1

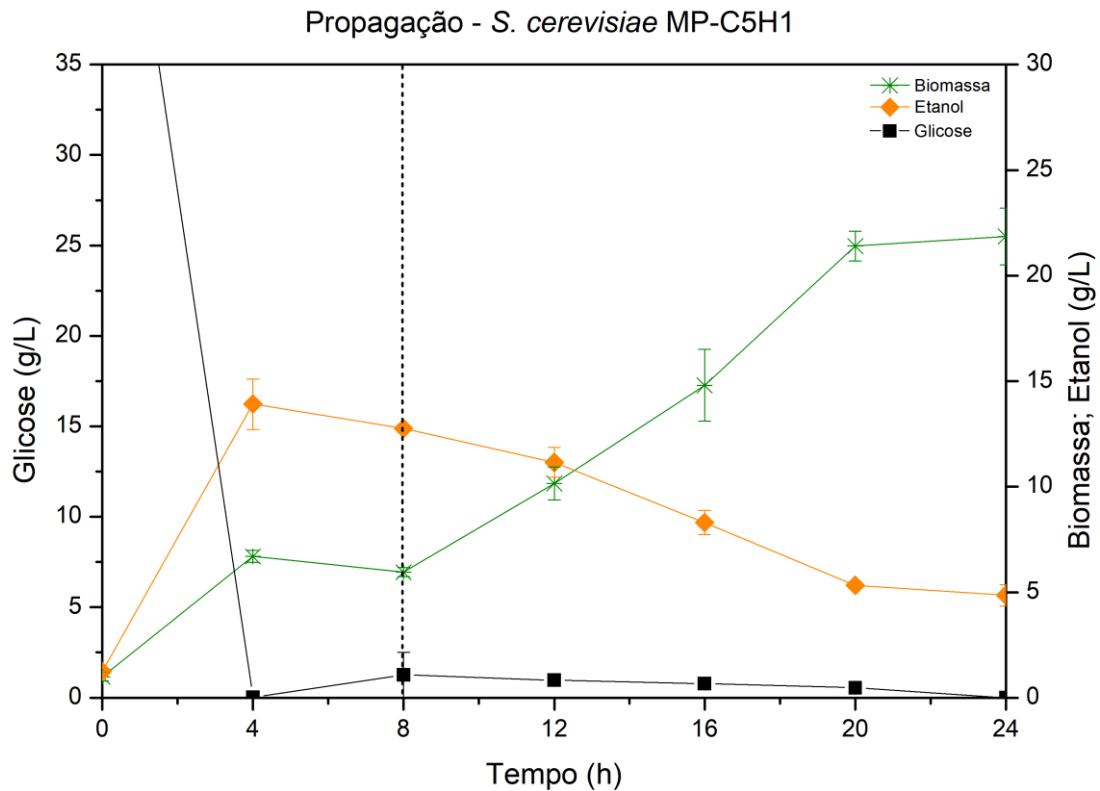
Esta etapa foi realizada em batelada alimentada, ou também denominada de propagação descontínua alimentada, visando uma maior efetividade na produção celular da *S. cerevisiae* MP-C5H1. A alimentação ocorreu em uma vazão constante e os nutrientes foram adicionados de forma gradual, mantendo os níveis de glicose sempre baixos, assim como sugere Schmidell et al. (2001). Esta técnica consiste em regular o metabolismo para que o substrato seja direcionado para o crescimento e não deslocado para produção de etanol, através de aumento da eficiência de conversão da glicose em células.

O acúmulo de etanol na propagação de células, pode ser controlado, porém dificilmente eliminado. Uma característica intrínseca da *S. cerevisiae* é seu metabolismo respiro-fermentativo, também conhecido como *Crabtree* (*crabtree*-positiva), que apresenta uma repressão do metabolismo respiratório conforme a disponibilidade de glicose no meio. A levedura quando exposta a altas concentrações de glicose, excede a capacidade da enzima piruvato desidrogenase, responsável por oxidar o piruvato em acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico e gás carbônico, o que direciona então à produção de piruvato descarboxilase e consequentemente a produção de etanol, este efeito é conhecido como *Crabtree short-term* (DOBRESCU et al., 2021; LIMA et al., 2019; TEIXEIRA, 2015).

Como observado na Figura 11, de 0 a 4 h o conteúdo de glicose é consumido muito rapidamente pela levedura e produziu cerca de 6 g/L de biomassa. Após o início da alimentação, após 8 h de processo, a glicose foi sendo alimentada de forma lenta, mantendo sua concentração em torno de 1 g/L, onde observa-se o crescimento linear de concentração de biomassa até 20 h, onde encerra-se o crescimento celular, momento em que não houve mais alimentação. A biomassa obtida no final da propagação apresentou concentração de 21 g/L, resultado obtido através de análise gravimétrica de crescimento celular (item 3.4.3). Após o processo de

centrifugação de todo líquido propagado retirado da dorna do biorreator, separando as células do sobrenadante, a concentração final obtida foi de 166,8 g/L obtido conforme item 3.4.3.

Figura 11 - Cinética de propagação da *S. cerevisiae* MP-C5H1 em regime de batelada alimentada. A seta indica o início da alimentação da glicose.

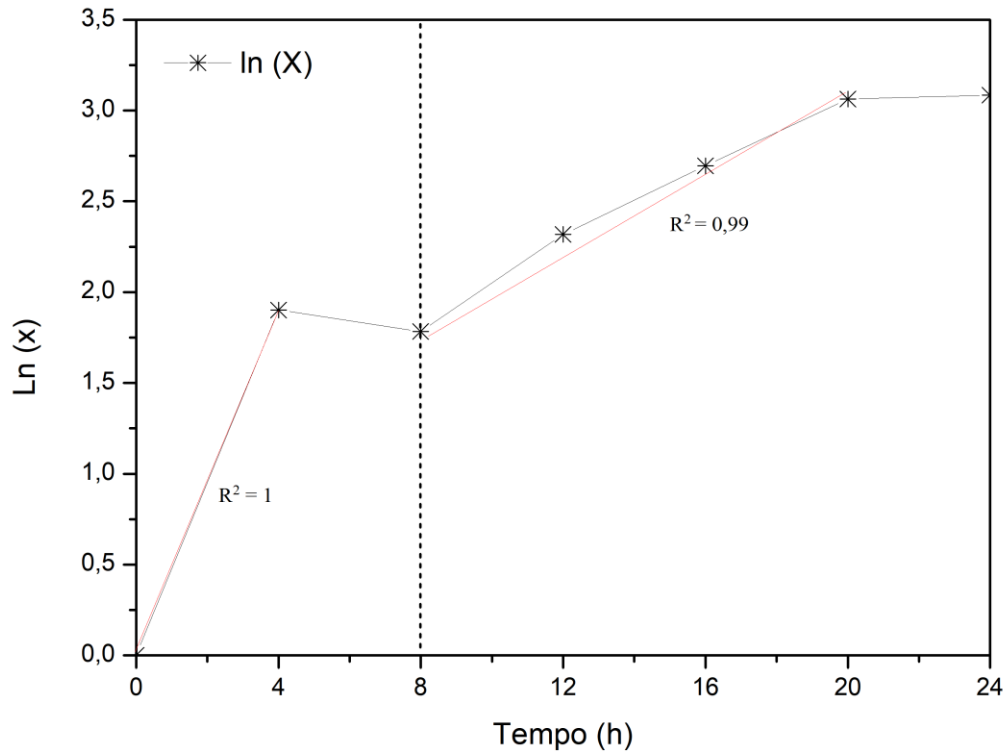


A linha tracejada indica o pulso seguido do início da alimentação em 8 h de processo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados de velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) da levedura foram analisados considerando o período de 0 a 4 h. Para obtenção do μ_{\max} , foi realizado o ajuste linear de crescimento com os valores da biomassa produzida em (g/L). O tempo zero foi considerado nos cálculos, devido ao preparo da levedura anteriormente a propagação, com o pré-inóculo, inóculo e em seguida a propagação em biorreator, onde a levedura já estava adaptada ao meio de cultura e em fase de crescimento. A Tabela 4 mostra os resultados dos cálculos realizados na cinética de propagação para parâmetros como fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e a produtividade (Q_x). Os dados foram comparados com o estudo de Pereira (2020), que realizou o mesmo procedimento com essa levedura.

Figura 12 - Perfil de crescimento celular da *S. cerevisiae* MP-C5H1 em biorreator. Os coeficientes angulares das regressões lineares indicam μ_{\max} distintos para os regimes de condução em batelada e batelada alimentada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos da propagação da *S. cerevisiae* MP-C5H1 em batelada alimentada com meio contendo glicose.

μ_{\max} (h^{-1})	Glicose consumida (g)	Biomassa produzida (g)	$Y_{X/S}$ (gX/gS)	Q_x (g/L/h)	Fonte
0,48	280	$91,30 \pm 5,10$	$0,33 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,04$	Este trabalho
0,46	227	$89,38 \pm 0,55$	$0,39 \pm 0,00$	$1,01 \pm 0,00$	(PEREIRA, 2020)

μ_{\max} calculado de 0 a 4 h (batelada).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparando os valores citados na Tabela 4, podemos observar que a glicose consumida foi maior neste trabalho, porém os parâmetros cinéticos de $Y_{X/S}$ e Q_x foram discretamente menores. Os dados de velocidade máxima específica de crescimento deste trabalho foram avaliados para a etapa de batelada, onde foi encontrado μ_{\max} , de $0,48 h^{-1}$ ($R^2 = 1$). Quando confrontamos os valores apenas de velocidade específica máxima do regime de batelada de Pereira (2020), $0,46 h^{-1}$ para um protocolo semelhante de propagação da mesma levedura (*S. cerevisiae* MP-C5H1), vemos que não há diferença significativa.

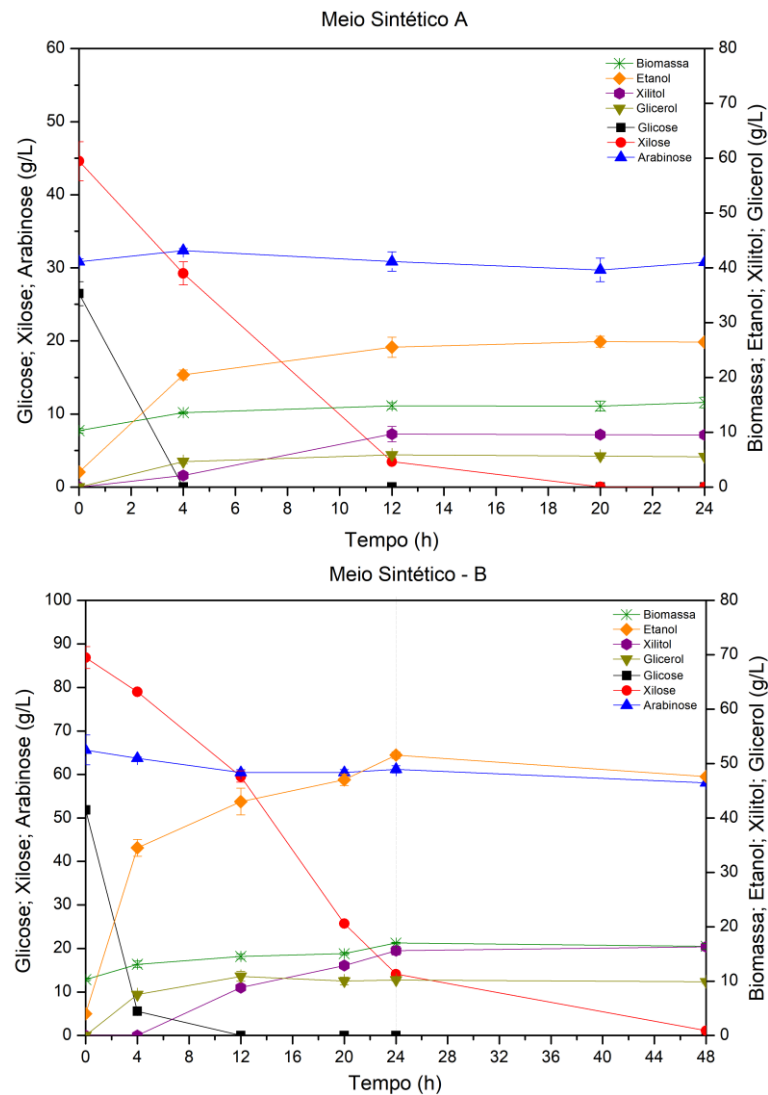
4.4.2 Avaliação da fermentação usando meio sintético rico em pentoses

As xilanas são o tipo de estrutura mais presente na fração hemicelulósica que ocorre na natureza. Consiste basicamente em xilose, podendo conter outros açúcares em outras subcategorias como as arabinoxilanas. As arabinoxilanas e outras estruturas contêm arabinose, em menores quantidades, como as da fração pécica com a presença das arabinogalactanas, por exemplo. Por conseguinte, os hidrolisados hemicelulósicos majoritariamente possuem xilose em maiores quantidades e arabinose em menores quantidades (BANERJEE et al., 2019; SEYFRIED et al., 2016). Sabendo que o hidrolisado obtido do resíduo de acerola tem arabinose na sua composição, foram utilizadas duas concentrações iniciais diferentes de açúcares na fermentação de meios sintéticos (A e B), para avaliar o efeito que a arabinose em maiores quantidades poderia ter sobre o metabolismo da levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1.

Na Figura 13 (A) e (B), podemos observar a cinética de fermentação nos dois meios sintéticos que foram realizadas com os mesmos parâmetros de processo (*shaker*, 150 rpm, 30 °C) e quantidade inicial de células, porém, diferindo na quantidade inicial de açúcares.

Para a fermentação com o meio sintético A (Figura 13 (A)), foi utilizado um total de \cong 100 g/L de açúcares, sendo xilose (\cong 44 g/L), glicose (\cong 26 g/L) e arabinose (\cong 30 g/L), simulando as concentrações obtidos no hidrolisado de acerola concentrado. No início da operação, o consumo dos açúcares xilose e glicose iniciou de forma concomitante. O esgotamento da glicose ocorreu nas 4 h e o da xilose apenas em 20 h, ou seja, 100% destes açúcares foram consumidos até as primeiras 20 h da fermentação. Como demonstra a Figura 13 (A), a fermentação se encerrou nas primeiras 12 h. A presença da arabinose foi constante, do começo ao final da fermentação, não apresentando nenhum tipo de consumo. O acúmulo de produtos da fermentação também foi acompanhado com a produção de 25,5 g/L de etanol, 9,7 g/L de xilitol e 5,9 g/L de glicerol, todos produtos comuns das rotas metabólicas gerais da fermentação com hexoses e pentoses.

Figura 13 - Avaliação do crescimento celular, evolução do consumo de substrato (glicose e xilose) e formação de produtos (etanol, xilitol, glicerol) em meio hemicelulósico sintético com diferentes concentrações de açúcares.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a fermentação com o meio sintético B (Figura 13 (B)), a concentração inicial total de açúcares foi $\cong 204$ g/L, sendo xilose ($\cong 86$ g/L), glicose ($\cong 51$ g/L) e arabinose ($\cong 65$ g/L), simulando o dobro das concentrações do hidrolisado hemicelulósico concentrado. Da mesma forma que a fermentação A, o consumo dos açúcares xilose e glicose iniciou ao mesmo tempo, com o esgotamento da glicose ocorrendo em 12 h da fermentação. A xilose não foi consumida por completo, sendo diminuído em 83,7 % do seu conteúdo inicial em 24 h de processo, que se entende onde a fermentação parou de ocorrer. O esgotamento da xilose ocorreu apenas em 48 h, o que nos indica que a levedura estava apenas utilizando-a como fonte de energia e não houve

formação de produtos a partir de 24 h. Cerca de 51 g/L de etanol, 15,6 g/L de xilitol e 10 g/L de glicerol foram produzidos.

Ao compararmos as duas fermentações citadas acima através da análise estatística dos parâmetros cinéticos (Tabela 5), podemos considerar que as fermentações em meio sintético A encerrado em 12 h e a fermentação em meio sintético B encerrado em 24 h foram iguais. Observa-se também os parâmetros cinéticos, a conversão total de substratos em produtos (Tabela 5), foi igual para as duas fermentações 1,37 g/g (A) e 1,28 g/g (B). A produtividade de etanol foi igual entre A e B, apresentando valor de 1,97 g/L/h em relação a 1,90 g/L/h respectivamente. No parâmetro de rendimento de produtividade de etanol, os valores sem diferença significativa de 65,16% e 68,3% foram encontrados para fermentação com os meios A e B.

Tabela 5 - Resultados gerais das fermentações em *shaker* com a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 em meio sintético A ($\cong 100$ g/L) e meio sintético B ($\cong 204$ g/L) e em biorreator com hidrolisado hemicelulósico obtido do resíduo de acerola.

	Meio sintético A	Meio sintético B	Liquor
Parâmetro (g/L)			
Glicose _{inicial}	26,5 ± 1,6	51,9 ± 1,0	12,9 ± 2,3
Glicose _{final}	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 2,8
Glicose _{consumida}	26,5 ± 1,6	51,9 ± 1,0	8,7 ± 2,0
Xilose _{inicial}	44,6 ± 2,7	86,9 ± 2,5	25,0 ± 0,5
Xilose _{final}	3,50 ± 0,2	14,1 ± 0,4	22,8 ± 0,6
Xilose _{consumida}	41,18 ± 2,0	80,7 ± 12,3	2,3 ± 0,17
Arabinose _{inicial}	30,8 ± 0,4	65,6 ± 3,4	22,3 ± 3,4
Arabinose _{final}	30,8 ± 1,3	61,2 ± 0,8	21,7 ± 0,8
Biomassa _{final}	14,8 ± 0,6	17,0 ± 0,1	9,0 ± 0,0
Etanol _{inicial}	2,7 ± 0,0	4,0 ± 0,2	0,0 ± 0,0
Etanol _{final}	25,5 ± 1,8	51,6 ± 0,6	9,6 ± 0,4
Xilitol _{final}	9,7 ± 1,4	15,6 ± 0,8	1,9 ± 0,1
Glicerol _{final}	5,9 ± 0,5	10,2 ± 0,2	2,4 ± 0,1
*Tempo (h)	12	24	9
Fator de conversão (g/g)			
*Y _{P/S}	1,37 ± 0,2 ^{ab}	1,28 ± 0,00 ^a	1,66 ± 0,32 ^b
Y _{Etanol/S}	0,35 ± 0,03 ^a	0,31 ± 0,07 ^a	0,72 ± 0,00 ^b
Y _{Xilitol/S}	0,23 ± 0,04 ^a	0,17 ± 0,04 ^a	0,74 ± 0,45 ^b
Y _{Glicerol/S}	0,79 ± 0,02 ^a	0,80 ± 0,07 ^a	0,18 ± 0,01 ^b
Produtividade (Q_p) (g/L/h)			
Etanol	1,97 ± 0,15 ^a	1,90 ± 0,13 ^a	1,07 ± 0,05 ^b
Xilitol	0,81 ± 0,12 ^a	0,65 ± 0,03 ^a	0,20 ± 0,01 ^b
Glicerol	0,49 ± 0,04 ^c	0,43 ± 0,01 ^b	0,27 ± 0,01 ^a
Rendimento Etanol (%)	65,16 ± 1,10 ^a	68,32 ± 9,60 ^a	**93,3 ± 8,60 ^a

*Corresponde ao tempo em que não houve mais consumo de substrato. Y_{P/S} corresponde a conversão do substrato consumido (glicose + xilose) em produtos (etanol + xilitol + glicerol). ** Calculado ao final de 42 h. Médias com a mesma letra na mesma linha não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (p ≤ 0, 05).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para melhorar a produtividade de etanol utilizando *S. cerevisiae* recombinante, Pereira et al., (2021) estudou os efeitos de concentração celular inicial e proporções para a co-fermentação de sacarose e xilose em meios sintéticos. Foi descoberto que em um meio sintético contendo 30% de xilose e 70% de sacarose (que é transformada em glicose pela enzima extracelular invertase da *S. cerevisiae*, o consumo destes dois açúcares foi 100%. Para produtividade volumétrica global de etanol (Q_p), os autores encontraram 2,05 g/L/h, para Y_{Etanol/S} 0,43 g/g e Y_{Xilitol/S} 0,16 g/g, utilizando concentração inicial de 10 g/L de células, 70 g/L

de xilose e 30 g/L de sacarose+glicose. A fermentação com o meio sintético B apresentou concentrações mais próximas as que foram utilizadas por Pereira et al. (2021), e podemos notar através da Tabela 6, que a produtividade de etanol foi similar ($1,90 \pm 0,13$ g/L/h), e assim confirmar que esta fermentação foi tão eficiente quanto a fermentação destacada como a melhor em produtividade de etanol no trabalho usado para comparação.

Foi observado para ambas as fermentações (A e B), uma pequena formação de células nas primeiras horas da fermentação e após as primeiras horas, uma concentração constante. A produção de células chegou a $14,8 \pm 1,00$ g/L na fermentação A e $17 \pm 0,10$ g/L para fermentação B. Com concentração inicial celular de 11 g/L, Martínez-Jimenez et al., (2022), encontraram aumento celular em uma fermentação em meio sintético rico em xilose e sacarose, por consequência da absorção das hexoses. Este trabalho também cita o acúmulo de 7,48 g/L de glicerol, justificando um mecanismo de defesa da *S. cerevisiae* MP-C5H1 contra o rompimento celular por estresse osmótico e como possível auxílio na biossíntese celular.

Os resultados semelhantes obtidos nos parâmetros cinéticos como fator de conversão e rendimento de etanol, demonstram que a alta concentração de arabinose no meio ($\cong 65$ g/L), não interferiu no metabolismo da levedura durante a fermentação. Com essa conclusão, o tópico a seguir apresenta os resultados da fermentação para o hidrolisado hemicelulósico do resíduo de acerola.

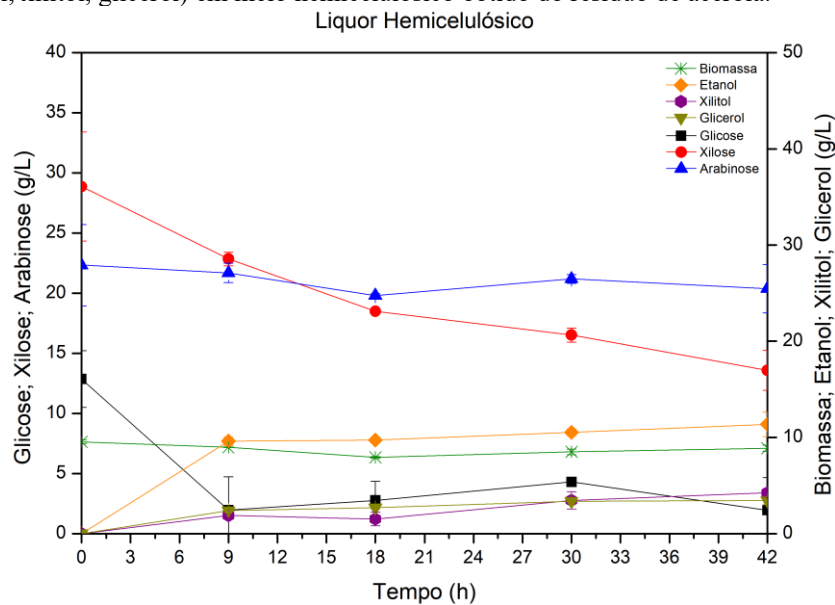
4.4.3 Avaliação da fermentação usando o hidrolisado hemicelulósico obtido do resíduo de acerola

A fermentação do hidrolisado hemicelulósico, em batelada em biorreator, foi iniciada após a etapa da propagação da levedura, onde o creme com alta densidade celular foi recolhido e armazenado para esta etapa de fermentação. Esta etapa ocorreu em duplicata com uma concentração celular inicial de 10 g/L. Vale ressaltar que esta concentração considerada de alta densidade celular, foi escolhida levando em consideração a presença dos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico, como o ácido acético e os compostos fenólicos totais, pois, ao iniciarmos a fermentação, uma porcentagem alta de células poderia não se adaptar aos inibidores e haver morte celular.

Com relação as fontes de carbono presentes na fermentação, o consumo ocorreu de forma lenta, gradual e incompleta, conforme a Figura 14. A glicose teve uma redução de cerca de 12 g/L no ponto inicial para 2 g/L nas primeiras 9 h, e a partir deste ponto permaneceu constante e sem alterações de consumo. A xilose apresentou decréscimo juntamente com a

glicose logo nas primeiras horas, porém de forma lenta, iniciando com $\cong 29$ g/L e finalizando com 13,6 g/L. A xilose não foi consumida por completo, com uma redução de apenas 53% do seu conteúdo inicial até o ponto de 42 h. No trabalho de Zanella (2018), que estudou a co-fermentação da glicose e da xilose em hidrolisado hemicelulósico, o mesmo comportamento de consumo lento da xilose foi encontrado para a levedura *S. cerevisiae* MP-P5 em um regime de batelada, porém com adição de compostos furânicos, onde seu consumo também não foi completo.

Figura 14 - Avaliação do crescimento celular, evolução do consumo de substrato (glicose e xilose) e formação de produtos (etanol, xilitol, glicerol) em meio hemicelulósico obtido do resíduo de acerola.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste de Tukey foi aplicado para avaliar se havia diferença estatística entre os tempos de 9 e 42 h para os produtos da fermentação. Conforme os resultados obtidos não foi detectado diferença significativa. Portanto, a fermentação com o hidrolisado hemicelulósico obtido do resíduo de acerola poderia ser encerrado em 9 h. Os dados da cinética desta fermentação podem ser observados na Tabela 5, onde o valor de produtividade de etanol (Q_p) foi 1,07 g/L/h e o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{\text{Etanol/S}}$) foi de 0,59 g/g. O rendimento de etanol encontrado (93%) demonstrou grande diferença ao encontrado por Pereira (2020), que foi cerca de 65% para fermentação com hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar, o que sugere um resultado superestimado. Outros trabalhos realizados com fermentação de hidrolisados hemicelulósicos, podemos observados na Tabela 6. Nota-se que o parâmetro cinético $Y_{\text{Etanol/S}}$ neste trabalho apresentou valor superior aos encontrados para outros hidrolisados hemicelulósicos, os quais variaram de 0,26 a 0,45 g/g e considera-se um valor superestimado.

Resultados inferiores poderiam ser encontrados realizando análises de açúcares redutores totais, que não foi realizado neste trabalho, aumentando assim, a concentração inicial de açúcares totais que a levedura consome, modificando o resultado para valores mais adequados a levedura e o fator de conversão. A produtividade de etanol (1,07 g/L/h) ficou abaixo na comparação com alguns trabalhos, principalmente de Pereira, (2020) usando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar (1,59 g/L/h) e de Dobrescu et al., (2021) na conversão do hidrolisado hemicelulósico de serragem de abeto (1,47 g/L/h), que foram os maiores valores encontrados. Neste mesmo parâmetro, este trabalho ficou acima do encontrado por Vargas et al. (2023) com a utilização de hidrolisado hemicelulósico de capim elefante.

Tabela 6 - Resultados obtidos da literatura de fermentações com diferentes hidrolisados hemicelulósicos e linhagens de levedura capazes de fermentar a xilose.

Levedura	Tipo de Biomassa	Etanol		Xilitol		Operação	Referência
		$Y_{\text{etanol/s}}$ (g/g)	Q_p (g/L/h)	$Y_{\text{xilitol/s}}$ (g/g)	Q_p (g/L/h)		
<i>S. cerevisiae</i> PE-2	Capim elefante	0,36	0,18	0,61	0,07	SHF	(VARGAS et al., 2023)
<i>S. passalidarum</i>	Cana de açúcar	0,44	-	0,14	-	SHF	(DIONÍSIO et al., 2021)
<i>S. cerevisiae</i> MEC 1133	Paulownia	0,26	0,51	-	-	SHF	(DOMÍNGUEZ et al., 2021)
<i>S. cerevisiae</i> cV-110	Serragem de abeto	0,45	1,47	-	-	SHF	(DOBRESCU et al., 2021)
<i>C. boidinii</i>	Fibras de milho	-	-	-	0,14	SHF	(FEHÉR et al., 2015)
<i>Ogataea zsolzii</i>	Farelo de trigo	-	-	0,55	0,23	SHF	(BEDŮ et al., 2019)
<i>S. cerevisiae</i> MP-C5H1	bagaço cana de açúcar	0,39	1,59	0,1	-	SHF	(PEREIRA, 2020)
<i>S. cerevisiae</i> STXQ	Cachos de palma	0,42	-	-	-	SHF	(LIU; HUANG; GENG, 2018)
<i>C. tropicalis</i> M2012462	Palha de milho	-	-	0,71	0,94	SHF	(WANG; LING; ZHAO, 2015)
<i>C. tropicalis</i>	hidrolisado de cascas de cacau	-	0,28	-	-	SHF	(VALLADARES-DIESTRA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2022)
<i>S. cerevisiae</i>		-	0,5	-	-		
<i>S. cerevisiae</i> MP-C5H1	Hidrolisado de bagaço de acerola	0,72	1,07	0,74	0,20	SHF	Este trabalho

SHF: Fermentação e hidrólise separadas; * hidrolisado contendo majoritariamente glicose proveniente da hidrólise da celulose.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os parâmetros cinéticos para o xilitol, conforme dados da Tabela 5, apresentaram produtividade (Q_p) e $Y_{\text{xilitol/S}}$ de respectivamente 0,20 g/L/h e 0,74 g/g. No trabalho de Vargas et al. (2023) e Fehér et al. (2015) foi encontrado valores de produtividade volumétrica de xilitol menores, 0,07 e 0,14 g/L/h respectivamente, do que neste trabalho. Os demais autores citados na tabela, apresentam produtividades maiores, entre 0,23 e 0,94 g/L/h. Mesmo comparando os resultados, ainda há uma certa peculiaridade na comparação entre as fermentações de diferentes biomassas, pois cada uma apresenta uma matriz biológica complexa e diferente.

Na literatura, a fermentação de hidrolisado de bagaço de acerola foi citado apenas uma vez por de Oliveira et al. (2021), porém não foi utilizado o hidrolisado hemicelulósico. No estudo citado foi avaliado o potencial de uso de resíduos de frutas da Amazônia para produção de etanol e a acerola estava entre elas. Foi realizado uma hidrólise ácida com 1% de ácido sulfúrico e em seguida, foi realizado a hidrólise enzimática do conteúdo sólido recuperado. Diferentemente deste trabalho, a fração utilizada como veículo da fermentação foi o resíduo sólido, e não o hidrolisado. Como resultado, de Oliveira et al. (2021) encontrou para $Y_{\text{etanol/s}}$ 0,12 g/g e para (Q_p) 0,15 g/L/h, valores menores do que encontrados neste trabalho. Vale ressaltar que a levedura utilizada foi a *S. cerevisiae* convencional, e a fermentação ocorreu em frascos de 250 mL (volume de reação de 100 mL em 24 h), com uma concentração de glicose inicial de 7,2 g/L. Como se tratava de uma levedura convencional, a utilização de pentoses não foi mencionada. Podemos vislumbrar diversas vantagens neste trabalho em relação ao trabalho de Oliveira et al. (2021), como o uso do hidrolisado com maior disponibilidade de açúcares, pentoses e hexoses, e a utilização de uma levedura recombinante capaz de fermentar duas fontes de açúcar (glicose e xilose) e convertê-los em etanol.

4.4.3.1 Análise da viabilidade celular durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de resíduo de acerola

Durante a fermentação, amostras foram coletadas para avaliar a viabilidade das células da *S. cerevisiae* MP-C5H1 considerando que o hidrolisado hemicelulósico de resíduo de acerola foi obtido através de hidrólise ácida. Sendo assim, além dos açúcares, componentes pertencentes a classe dos extrativos e fragmentos de lignina estão presentes no hidrolisado. Mesmo com alta densidade celular, o consumo dos componentes não foi completo. Conteúdos provenientes de compostos fenólicos totais e de degradação dos açúcares, a partir da hidrólise poderia estar impedindo o desempenho celular. A Tabela 7 mostra que a viabilidade celular permaneceu entre 77 e 86% (desconsiderando o valor do primeiro ponto 0 h) o que poderia ser

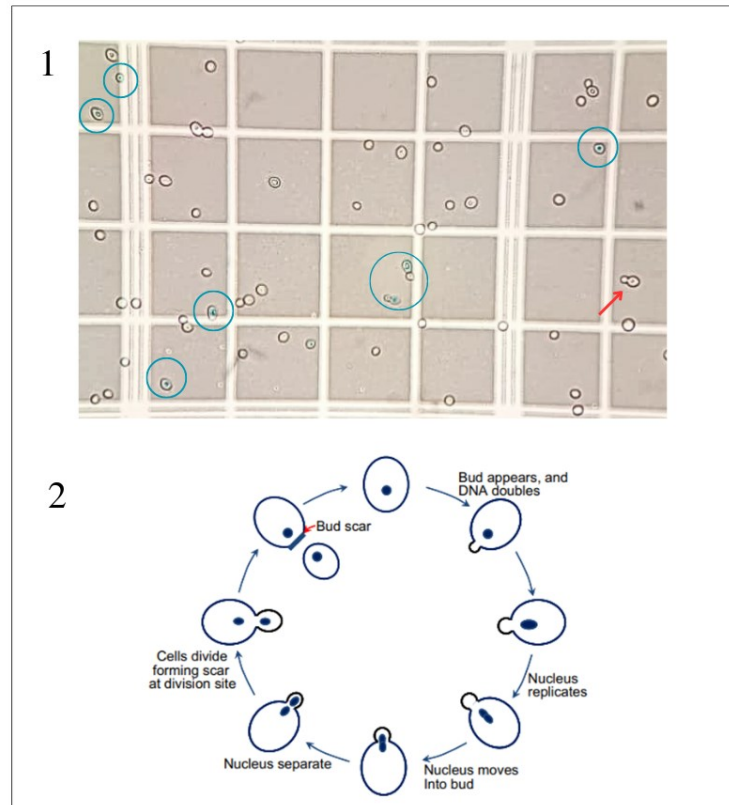
melhor, como em Pereira (2020), onde a viabilidade celular da fermentação do hidrolisado ficou em 97% (mínimo), em consequência, melhores resultados cinéticos. A levedura como demonstra a Figura 15 (1), não apresentou deformações na parede celular causada por estresse e demonstrou características específicas da *S. cerevisiae*, como formato oval, e algumas etapas do crescimento celular durante a microscopia. O crescimento observado na câmara de Neubauer incluiu as células se dividindo com núcleos separados, células ainda sem divisão, pequenos brotos e células mortas (LIU, 2013).

Tabela 7 - Análise da viabilidade celular de *S. cerevisiae* MP-C5H1 de amostra coletada durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de resíduo de acerola

Tempo (h)	Células vivas (%)	Células mortas (%)
0	67	33
3	81	19
12	86	14
21	77	23
36	78	22
48	78	22
60	82	18
72	84	16

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Leitura da viabilidade celular de *S. cerevisiae* MP-C5H1 de amostra coletada durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de resíduo de acerola através de microscopia em câmara de Neubauer.



1: Células mortas circuladas em azul, as demais, células vivas; Seta vermelha indica início do brotamento; 2: Indica o ciclo de reprodução da levedura, célula mãe, início do brotamento, replicação do núcleo, separação do núcleo, separação do broto da célula mãe.

Fonte: (1) Elaborado pelo autor (2) (LIU, 2013).

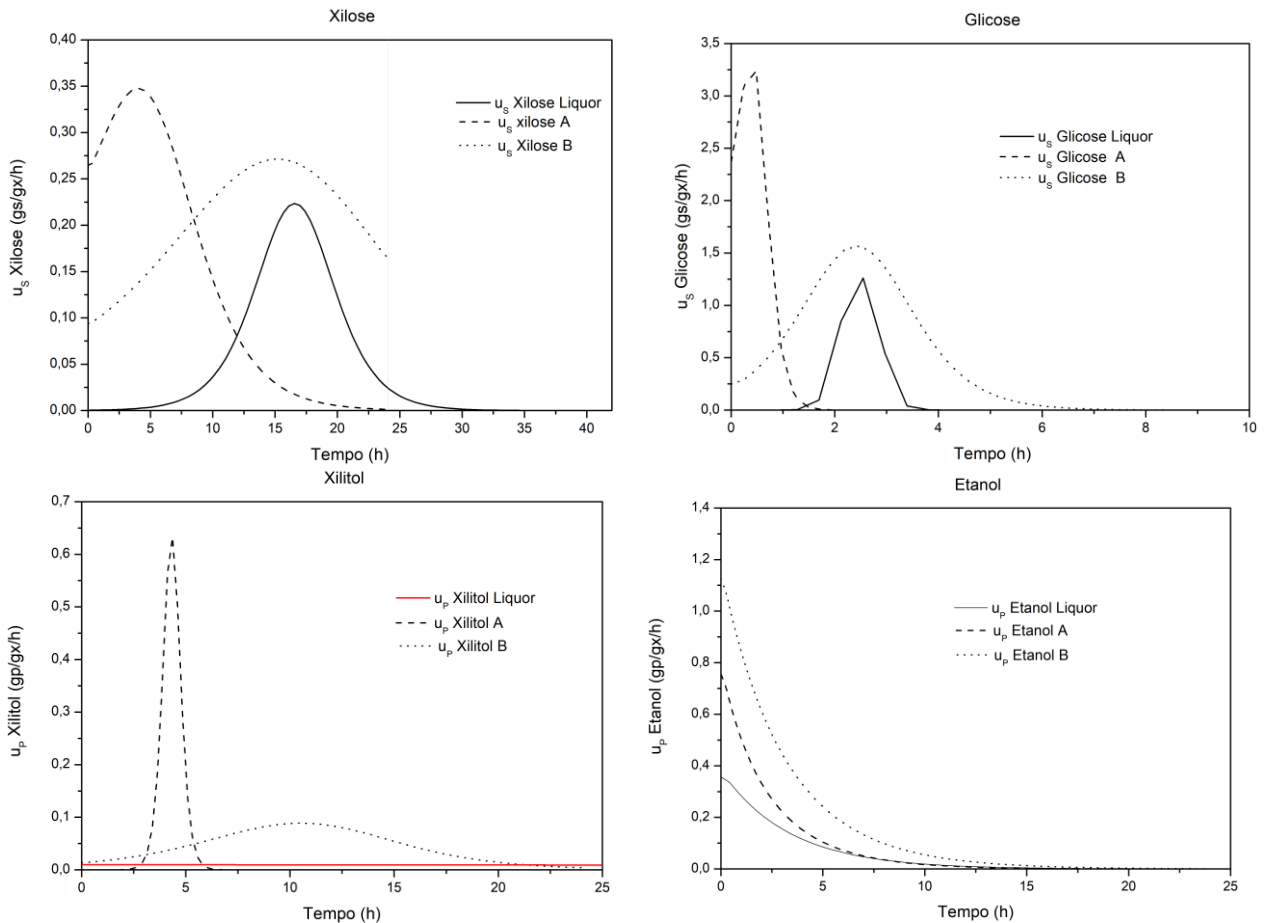
4.4.4 Comparação entre as fermentações em meio sintético e hidrolisado hemicelulósico do resíduo de acerola

A acerola é uma fruta que apresenta diversos compostos, como açúcares, altas concentrações de fitoquímicos e compostos bioativos, além daqueles que ainda não foram identificados ou quantificados (CHANG; ALASALVAR; SHAHIDI, 2019). Isto nos conduz a um pensamento de que o hidrolisado do bagaço de acerola deve possuir uma estrutura muito complexa. Quando comparamos a fermentação do hidrolisado complexo de acerola a uma fermentação com meio sintético definido, podemos observar que os valores dos parâmetros cinéticos (Tabela 6) da fermentação foram diferentes. A produtividade volumétrica de etanol e também os fatores de conversão de substrato em produtos (Tabela 6), foram maiores nos meios

sintéticos do que no hidrolisado hemicelulósico de acerola. Tal efeito pode ser atribuído a capacidade da levedura de se adaptar tanto a infinidade de compostos presentes no hidrolisado quanto aos agentes inibidores de fermentação no hidrolisado.

Outros parâmetros cinéticos que podem ser usados para avaliação da fermentação são as velocidades específicas de consumo de substrato (μ_S) e formação de produto (μ_P). Vale frisar que os cálculos utilizados neste trabalho foram realizados através do modelo sigmoidal de Boltzmann, onde obtivemos resultados que simulam todos os pontos das fermentações que não foram coletados e analisados em CLAE. Ao compararmos a velocidade específica de consumo (μ_S) da xilose e da glicose do hidrolisado hemicelulósico de acerola com a fermentação A (Figura 16), a qual apresenta concentrações de açúcar mais próxima, observamos que a velocidade do consumo da glicose e da xilose foi consideravelmente maior para a fermentação A. A glicose foi consumida por completo nas primeiras 2 h e a xilose ao final de 24 h. Em relação a esta comparação, podemos observar que a levedura apresentou um consumo mais lento quando o hidrolisado foi usado como meio de cultivo. Os valores máximos de μ_S da glicose para as fermentações com meio sintético A, B e com o hidrolisado hemicelulósico foram de 3,23, 1,57 e 1,26 gs/gx/h, respectivamente. Já para a xilose os valores de μ_S foram de 0,34, 0,27 e 0,22 gs/gx/h respectivamente. Para formação de produto (μ_P), as velocidades máximas alcançadas para produção de xilitol foram, no meio sintético A 0,63, no meio sintético B 0,088 e no hidrolisado hemicelulósico foi 0,010 gp/gx/h. Para etanol, na mesma ordem anterior, A 1,12, B 0,75 e hidrolisado hemicelulósico 0,35 gp/gx/h.

Figura 16 - Perfil de velocidade específica de consumo (μ_S) de glicose na xilose e perfil de velocidade de formação de produtos (μ_P), nos ensaios de fermentação do hidrolisado hemicelulósico obtido do resíduo de acerola e com o meio sintético de diferentes concentrações A e B.



A velocidade de consumo e de produção foram calculadas através de ajuste sigmoidal de Boltzmann usando as curvas de consumo de substrato e formação de produto, respectivamente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Entre os meios sintéticos A e B, observamos uma diferença no padrão de consumo da xilose e da glicose. Na fermentação B a xilose foi consumida mais lentamente e de forma incompleta. Já a glicose apresentou uma demora de quase 8 h para ser consumida por completo, diferentemente da A. Existe a possibilidade de a levedura ter sofrido um fenômeno característico da *S. cerevisiae* chamado repressão catabólica em todas as fermentações realizadas neste trabalho. Ao adicionarmos mais glicose no meio fermentativo, podemos ter desencadeado uma resposta fisiológica da levedura, a remodelação do seu metabolismo na presença de glicose, chamada repressão catabólica de carbono (TRICHEZ et al., 2023). Este fato observado na diferença de início do consumo da xilose, que é após o da glicose e mais

lento, levando a entender que houve um padrão de repressão catabólica, com ênfase no meio sintético B e no hidrolisado hemicelulósico.

A presença de inibidores encontradas no hidrolisado hemicelulósico de acerola é majoritariamente de ácido acético e compostos fenólicos totais. Inibidores como HMF e furfural não foram detectados, mas é importante salientar que mais compostos inibidores não avaliados neste trabalho possam ter sido formados, visto que as formas mais comumente encontradas derivam da celulose, hemicelulose e lignina. Aldeídos derivados de açúcares, ácidos orgânicos, benzoquinonas, compostos fenólicos e não fenólicos, todos estes são grupos que contém diversas possibilidades de produtos de degradação. Outra possibilidade de inibição no meio de cultura do hidrolisado hemicelulósico de acerola, é a presença de açúcares em estrutura de monômeros e oligômeros, como a celobiose (SJULANDER; KIKAS, 2020).

No trabalho de Zanella (2018) foi citado que mesmo as leveduras (*S. cerevisiae* MP-P5 e EZY-01) sendo capazes de converter o inibidor furfural adicionado a fermentação em meio sintético de co-fermentação de xilose e glicose, a presença de inibidores pode causar um desequilíbrio no metabolismo das células, que vai ser mais expressivo quando a fonte de carbono for xilose, do que glicose. Em geral, inibidores podem incapacitar proteínas celulares, membranas ou DNA, acidificar a matriz celular e desconfigurar a configuração lipídica da membrana celular. No caso do HMF e furfural especificamente, pode ainda aumentar a quantidade de oxigênio reativo intracelular e inativar enzimas da via glicolítica (SJULANDER; KIKAS, 2020; ZANELLA, 2018).

Algumas estratégias podem ser adotadas para melhorar a produtividade de etanol no hidrolisado hemicelulósico de acerola, como a citada no trabalho de Dobrescu et al. (2021), que estudou uma nova estratégia de propagação para melhorar o metabolismo da xilose durante a fermentação de cerragem de abeto. A realização da propagação celular ocorrer no meio utilizado na fermentação, poderia ser considerado uma adaptação de curto prazo e prover uma melhor adaptação para uma futura longa fermentação.

No trabalho de Wang; Ling; Zhao (2015), foi testado o aumento da concentração inicial celular de *C. tropicalis* M2012462 no hidrolisado de palha de milho e também em meio sintético, de 0,4 g/L para 1,6 g/L. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL. No meio sintético a produtividade e rendimento da produção de xilitol foram afetados com o aumento celular, porém um comportamento diferente foi observado para o hidrolisado. A partir do aumento celular, houve aumento no fator de conversão $Y_{Xilitol/S}$ de 0,67 para 0,71 g/g, produtividade de xilitol de 0,56 para 0,94 g/L/h e redução do tempo de fermentação em

37%, para o hidrolisado. A conclusão para esta melhoria na fermentação foi que o aumento celular alivia a ação dos inibidores.

Sob o ponto de vista de melhoria da levedura utilizada, a utilização de outras linhagens de leveduras poderia ser testada. A total conversão de açúcares durante uma fermentação para a produção de etanol é um desafio e a utilização da *S. cerevisiae* poderia ser afetada por não fermentar pentoses naturalmente, por este motivo, a co-cultura de *S. cerevisiae* poderia ser realizada junto a uma levedura fermentadora de xilose (NDUBUISI et al., 2023).

Entre as linhagens de leveduras que se destacam no consumo da xilose, além das geneticamente modificadas, duas leveduras não convencionais chamam atenção na produção de bioetanol de segunda geração, *Spathaspora passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis*. Estas leveduras são citadas por Trichez et al. (2023), como as melhores linhagens descritas até agora na co-fermentação de xilose e glicose, e de fato muito importante, são capazes de consumir outros açúcares como manose, galactose, arabinose e celobiose. Além disto, a *S. passalidarum* tem a capacidade de fermentar glicose, xilose e celobiose em condições limitadas de oxigênio, o que nos chama atenção, caso o hidrolisado hemicelulósico de acerola fosse utilizado para conversão total dos açúcares e produção de bioetanol de segunda geração. Mesmo assim, não se descarta a possibilidade das leveduras recombinantes, pois cada vez mais a engenharia metabólica vem descobrindo novos genes alvos para melhoria da utilização das leveduras na conversão de biomassas lignocelulósicas (TRICHEZ et al., 2023)

5 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível avaliar três diferentes concentrações de ácido diluído na hidrólise termoquímica do bagaço de acerola e foi encontrado que a melhor concentração de ácido diluído, 1,5% de H₂SO₄, chegando a concentrações de pentoses de 8,9 g/L de xilose e 5,6 g/L de arabinose. Além das pentoses, a glicose (1,3 g/L – hexose) e compostos inibidores como ácido acético (1,3 g/L) e compostos fenólicos totais (0,5 g/L) também foram quantificados nas análises. A hidrólise ácida foi eficiente, pois foi capaz de recuperar 119% de xilose e 611% de arabinose, extrapolando 100% devido a etapa de remoção de extrativos do bagaço sem pré-tratamento, utilizado como base de cálculos. Além da obtenção dos açúcares, foi possível caracterizar quimicamente o resíduo antes e depois do pré-tratamento. Foi obtido um hidrolisado hemicelulósico rico em pentoses e hexoses que foi submetido a fermentação como meio de cultura, após diversas etapas do pré-tratamento, como evaporação e hidrólise enzimática.

A etapa de fermentação utilizando a *S cerevisiae* MP-C5H1 em meios de cultura sintéticos em incubadora *Shaker*, em frascos Erlenmeyer agitados, demonstrou a rápida atividade da levedura. O desempenho da levedura no meio sintético A foi de 12 h com uma produtividade de etanol (Q_P) de 1,97 g/L/h, já no meio sintético B, houve características de repressão catabólica pela glicose, devido sua alta concentração. A produtividade encontrada para o meio B foi 1,90 g/L/h, sem diferença significativa com o meio A. Não foi encontrado efeito inibitório pela presença de arabinose nos meios sintéticos.

Os resultados obtidos na fermentação em batelada em biorreatores, utilizando o hidrolisado hemicelulósico de acerola como meio de cultura em alta densidade celular de *S cerevisiae* MP-C5H1 como agente fermentador pode ser considerada uma boa opção para produção de bioetanol e para recuperação do açúcar de alto valor, arabinose.

Conclui-se que com os parâmetros cinéticos avaliados na fermentação com o hidrolisado hemicelulósico de acerola nos indica perspectivas de utilização como meio de cultura e demonstra potencial para a produção de produtos de alto valor agregado através da fermentação como o etanol, xilitol e arabinose.

Este trabalho serve como apoio para futuros trabalhos utilizando o hidrolisado hemicelulósico de acerola como meio de cultura para fermentações. Após estabelecidos os potenciais produtos de aproveitamento utilizando a *S cerevisiae* MP-C5H1, é possível adotar estratégias que direcionem a fermentação ao produto desejado. Diversas modificações operacionais podem ser realizadas, como testes de fermentação com aeração, regimes de

batelada alimentada, mudança na densidade celular e até mesmo a utilização de leveduras com foco na biopurificação da arabinose.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar um planejamento experimental para definir a melhor concentração de ácido sulfúrico diluído para extração dos açúcares, sempre visando a redução de seu uso e custos.
- Continuar os testes de fermentação com o hidrolisado hemicelulósico de acerola utilizando diferentes cepas de leveduras modificadas e não convencionais para determinar a levedura de melhor eficiência no produto desejado, para futuro escalonamento de processo, como *Spathaspora passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis* na produção de etanol.
- Realizar a fermentação em estratégia operacional de batelada alimentada para melhorar a produtividade de etanol e também reduzir a inibição da levedura pelos compostos presentes no hidrolisado hemicelulósico de acerola.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. et al. Rare sugars and their health effects in humans: a systematic review and narrative synthesis of the evidence from human trials. **Nutrition Reviews**, v. 80, p. 255–270, 2022.
- ALVES, H. **Aproveitamento de resíduos de acerola verde (Malpighia emarginata DC.) para obtenção de açúcares utilizando tratamento ácido e enzimático**. Dissertação—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2021.
- ANTONISAMY, A. J. et al. Sustainable approaches on industrial food wastes to value-added products – A review on extraction methods, characterizations, and its biomedical applications. **Environmental Research**, v. 217, 15 jan. 2023.
- BAKSI, S. et al. Conversion of biomass to biofuels through sugar platform: A review of enzymatic hydrolysis highlighting the trade-off between product and substrate inhibitions. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 55, 1 fev. 2023.
- BANERJEE, S. et al. Hemicellulose based biorefinery from pineapple peel waste: Xylan extraction and its conversion into xylooligosaccharides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 117, p. 38–50, 1 set. 2019.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, nov. 2008.
- BEDŐ, S. et al. Optimised fractionation of wheat bran for arabinose biopurification and xylitol fermentation by *Ogataea zsoletii* within a biorefinery process. **Industrial Crops and Products**, v. 139, 1 nov. 2019.
- BELTRAMI, M. C.; DÖRING, T.; LINDNER, J. D. D. Sweeteners and sweet taste enhancers in the food industry. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 38, n. 2, p. 181–187, 1 abr. 2018.
- BELWAL, T. et al. Phytopharmacology of Acerola (*Malpighia* spp.) and its potential as functional food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, p. 99–106, abr. 2018.
- BORGES, O. M. A. et al. Integrated green-based methods to recover bioactive compounds from by-product of acerola processing. **LWT**, v. 151, 1 nov. 2021.
- BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals - A review. **Chimia**, v. 69, n. 10, p. 572–581, 1 out. 2015.
- CAETANO, A. C. S. et al. Evaluation of antioxidant activity of agro-industrial waste of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) fruit extracts | Avaliação da atividade antioxidante de extratos de

- resíduo agroindustrial de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 769–775, 2011.
- CARMO, J. S.; NAZARENO, L. S. Q.; RUFINO, M. S. M. Characterization of the acerola industrial residues and prospection of their potential application as antioxidant dietary fiber source. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 236–241, 2018.
- CHANG, S. K.; ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects—A comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1580–1604, 2019.
- CHENG, H. et al. A novel method to prepare L-Arabinose from xylose mother liquor by yeast-mediated biopurification. **Microbial Cell Factories**, v. 10, 7 jun. 2011.
- CHERUBINI, F. et al. Toward a common classification approach for biorefinery systems. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 3, n. 5, p. 534–546, set. 2009.
- CNPEN. **Caracterização Química de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar**. São Paulo, nov. 2019.
- DE OLIVEIRA, J. A. R. et al. Evaluation of the technological potential of four wastes from Amazon fruit industry in glucose and ethanol production. **Journal of Food Process Engineering**, v. 44, n. 2, 2021.
- DIONÍSIO, S. R. et al. Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse. **Fuel**, v. 304, 15 nov. 2021.
- DOBRESCU, A. C. et al. Novel propagation strategy of *saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism during fermentation on softwood hydrolysate. **Fermentation**, v. 7, n. 4, 1 dez. 2021.
- DOMÍNGUEZ, E. et al. Hemicellulosic bioethanol production from fast-growing paulownia biomass. **Processes**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 2021.
- DU PASQUIER, J.; PAËS, G.; PERRÉ, P. Principal factors affecting the yield of dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 369, 1 fev. 2023.
- EMBRAPA. **INSTRUÇÕES PARA O CULTIVO DA ACEROLA**. , 1996.
- FDA. **GRAS NOTIFICATION FOR L-ARABINOSE (BETAWELL® ARABINOSE)** . Phoenix, 2018.
- FEHÉR, C. et al. Integrated process of arabinose biopurification and xylitol fermentation based on the diverse action of *Candida boidinii*. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, n. 4, p. 587–597, 2015.

- GONÇALVES, D. L. **Influência dos transportadores de açúcares na fermentação de xilose por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese de Doutorado—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.
- HAO, L. et al. Protective effects of L-arabinose in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. **Food and Nutrition Research**, v. 59, 10 dez. 2015.
- IBGE. – **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - Censo Agropecuário**. , 2017.
- IOANNIDOU, S. P. et al. Pretreatment/fractionation and characterization of winery waste streams within an integrated biorefinery concept. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 27, 1 jun. 2022.
- KHAIRE, K. C.; MOHOLKAR, V. S.; GOYAL, A. Bioconversion of sugarcane tops to bioethanol and other value added products: An overview. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 4, p. 54–68, 1 jan. 2021.
- KUMAR, V. et al. A critical review on current strategies and trends employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 299, 1 mar. 2020.
- KURAKAKE, M. et al. Production of L-Arabinose from Corn Hull Arabinoxylan by *Arthrobacter aurescens* MK5 α -L-Arabinofuranosidase. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. C231–C235, 2011.
- LIMA, U. DE A. et al. **Biotecnologia Industrial, Volume 3 - Processos fermentativos e enzimáticos** . 2. ed. São Paulo: Blucher, 2019. v. 3
- LIU, S. **BIOPROCESS ENGINEERING - KINETICS, BIOSYSTEMS, SUSTAINABILITY, AND REACTOR DESIGN**. Syracuse: Elsevier, 2013.
- LIU, T.; HUANG, S.; GENG, A. Recombinant diploid *saccharomyces cerevisiae* strain development for rapid glucose and xylose co-fermentation. **Fermentation**, v. 4, n. 3, 30 jul. 2018.
- MARQUES, T. R. et al. Metanolic extract of *Malpighia emarginata* bagasse: Phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 191–196, 2016.
- MARTÍNEZ-JIMENEZ, F. D. et al. Integration of first- and second-generation ethanol production: Evaluation of a mathematical model to describe sucrose and xylose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Renewable Energy**, v. 192, p. 326–339, 1 jun. 2022.

- MENEZES, F. F. et al. Depolymerization of enzymatic hydrolysis lignin: Review of technologies and opportunities for research. **Fuel**, v. 342, p. 127796, jun. 2023.
- MESQUITA, A. C. N. DE. **Composição nutricional de resíduos de frutas com uso potencial na alimentação de aves**. Dissertação de Mestrado—Mossoró: Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2018.
- MONTEIRO, A. F. et al. High concentration and yield production of mannose from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.
- NARAYANAN, V.; SANDSTRÖM, A. G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Re-evaluation of the impact of BUD21 deletion on xylose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering Communications**, v. 16, jun. 2023.
- NDUBUISI, I. A. et al. Non-conventional yeast strains: Unexploited resources for effective commercialization of second generation bioethanol. **Biotechnology Advances**, v. 63, 1 mar. 2023.
- NORRIS, J. R.; ET RIBBONS, D. W. **Methods in Microbiology**. London: Academic Press, 1969. v. 1
- NOVOZYMES. **FUEL ETHANOL APPLICATION SHEET Cellic® CTec2 and HTec2-Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials**. , 2010.
- NREL. **Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: 08/12/1996**. , 2008a. Disponível em: <www.nrel.gov>
- NREL. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011)**. , 2008b. Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>
- OEHLING, V. et al. I-Arabinose triggers its own uptake via induction of the arabinose-specific Gal2p transporter in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, 23 ago. 2018.
- PARK, N. H. et al. A new method for the preparation of crystalline L-arabinose from arabinoxylan by enzymatic hydrolysis and selective fermentation with yeast. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 411–416, 2001.
- PEREIRA, I. D. O. et al. Comparison of *Spathaspora passalidarum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for integration of first-and second-generation ethanol production. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 6, 1 set. 2021.

- PEREIRA, I. DE O. **Aproveitamento da xilose presente na fração hemicelulósica do bagaço de cana de açúcar para estabelecer uma estratégia de produção de etanol.** Dissertação—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2020.
- PING, Y. et al. Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 86–91, 5 jun. 2013.
- POL, K.; MARS, M. L-arabinose and d-xylose: Sweet pentoses that may reduce postprandial glucose and insulin responses. **Food and Nutrition Research**, v. 65, 2021.
- POL, K.; PUHLMANN, M. L.; MARS, M. Efficacy of L-Arabinose in Lowering Glycemic and Insulinemic Responses: The Modifying Effect of Starch and Fat. **Foods**, v. 11, n. 2, 1 jan. 2022.
- POLETTI, P. et al. Recovery of ascorbic acid, phenolic compounds and carotenoids from acerola by-products: An opportunity for their valorization. **LWT**, v. 146, 2021.
- PRAKASH, A.; BASKARAN, R. Acerola, an untapped functional superfruit: a review on latest frontiers. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 9, p. 3373–3384, 2018.
- RASHID, T. et al. Evaluation of current and future solvents for selective lignin dissolution—A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 321, 1 jan. 2021.
- SABINO, L. B. DE S. et al. Polysaccharides from acerola, cashew apple, pineapple, mango and passion fruit co-products: Structure, cytotoxicity and gastroprotective effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 24, 1 out. 2020.
- SALEEM, A. et al. Acid hydrolysis optimization of pomegranate peels waste using response surface methodology for ethanol production. **Springer-Verlag GmbH Germany**, v. 12, 2022.
- SANCHO, S. D. O. et al. Characterization of the industrial residues of seven fruits and prospection of their potential application as food supplements. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.
- SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. 1º ed. São Paulo: Blucher, 2001. v. 2
- SEYFRIED, M. et al. Pectinas de plantas medicinais: Características estruturais e atividades imunomoduladoras. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 201–214, 1 jan. 2016.
- SGANZERLA, W. G. et al. Techno-economic assessment of subcritical water hydrolysis process for sugars production from brewer's spent grains. **Industrial Crops and Products**, v. 171, 1 nov. 2021.
- SILVA, P. B.; DUARTE, C. R.; BARROZO, M. A. S. Dehydration of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residue in a new designed rotary dryer: Effect of process variables on main bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 62–70, 2016.

- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1 jan. 1999.
- SJULANDER, N.; KIKAS, T. Origin, impact and control of lignocellulosic inhibitors in bioethanol production—A review. **Energies**, v. 13, n. 18, 1 set. 2020.
- SONG, Y. B. et al. Protective effect of arabinose and sugar beet pulp against high glucose-induced oxidative stress in LLC-PK 1 cells. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 189–194, set. 2012.
- SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49–58, 1 jan. 2016.
- TEIXEIRA, J. D. F. **A levedura *Saccharomyces Cerevisiae*: Caracterização do gênero, domesticação e importância na composição de vinhos**. Monografia—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.
- TRICHEZ, D. et al. Identification of traits to improve co-assimilation of glucose and xylose by adaptive evolution of *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis* yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1 fev. 2023.
- USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **National Nutrient Database for Standard Reference.**, 2019.
- VALLADARES-DIESTRA, K. K. et al. Citric acid assisted hydrothermal pretreatment for the extraction of pectin and xylooligosaccharides production from cocoa pod husks. **Bioresource Technology**, v. 343, 1 jan. 2022.
- VALLADARES-DIESTRA, K. K.; VANDENBERGHE, L. P. DE S.; SOCCOL, C. R. A biorefinery approach for pectin extraction and second-generation bioethanol production from cocoa pod husk. **Bioresource Technology**, v. 346, 1 fev. 2022.
- VARGAS, A. C. G. et al. Batch Fermentation of Lignocellulosic Elephant Grass Biomass for 2G Ethanol and Xylitol Production. **Bioenergy Research**, 2023.
- WANG, W.; LING, H.; ZHAO, H. Steam explosion pretreatment of corn straw on xylose recovery and xylitol production using hydrolysate without detoxification. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 10, p. 1623–1628, 1 out. 2015.
- WISSELINK, H. W. et al. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 15, p. 4881–4891, ago. 2007.

WONGFAED, N. et al. Taxonomic and enzymatic basis of the cellulolytic microbial consortium KCU-MC1 and its application in enhancing biomethane production. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 2968, 1 dez. 2023.

ZANELLA, E. **Influência de compostos furânicos em leveduras assimiladoras de pentoses**. Dissertação—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.