



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUIZA FAVARATO SANTOS

**ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA COMO
FERRAMENTA DE SELEÇÃO DIRECIONADA EM
S. cerevisiae PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G
PELA CASCA DE COCO VERDE**

VITÓRIA

2019

LUIZA FAVARATO SANTOS

**ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA COMO
FERRAMENTA DE SELEÇÃO DIRECIONADA EM
S. cerevisiae PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G
PELA CASCA DE COCO VERDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr.^a Patricia Machado Bueno Fernandes

VITÓRIA
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

S237a Santos, Luiza Favarato, 1995 -
Alta pressão hidrostática como ferramenta de seleção direcionada em
S. cerevisiae para produção de etanol 2G pela casca de coco verde / Luiza
Favarato Santos – 2019.
63 f. : il.

Orientador: Patricia Machado Bueno Fernandes.
Coorientador: Antônio Alberto Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Etanol. 2. Pressão Hidrostática. 3. *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Cocos. I. Fernandes, Patricia Machado Bueno. II. Fernandes, Antônio
Alberto. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 61

LUIZA FAVARATO SANTOS

**ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA COMO FERRAMENTA DE SELEÇÃO
DIRECIONADA EM *S. cerevisiae* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G PELA
CASCA DE COCO VERDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 11 de março de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Patricia Machado Bueno
Fernandes

Universidade Federal do Espírito Santo

Orientador

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos

Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves
Torres

Universidade Nacional de Brasília

“Só se tem curiosidade inquieta de saber aquele que, sabendo que sabe, sabe que sabe pouco e que pode e precisa saber mais. Não é a curiosidade que se tenha quem sabe abarrotado de saber.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Meu eterno e genuíno obrigada à Universidade Federal do Espírito Santo, instituição na qual me formei e realizei meu mestrado, por todas as oportunidades oferecidas, pelo ambiente propício para o crescimento pessoal e profissional e a todos os profissionais que nela trabalham.

Agradeço a todas as agências de fomento: CAPES, FAPES, CNPq e FINEP pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, aos professores, os quais tenho profunda admiração, e a Miriam, secretária do programa, sempre disposta a ajudar com um sorriso no rosto, meu muito obrigada.

Imensa gratidão ao Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio e seus membros: Doutores, Mestres e Graduandos, por me ensinarem tanto sobre trabalho em equipe e estarem sempre disponíveis para me auxiliar no que for preciso e todos os professores que o compõem por todo o suporte, aprendizado e oportunidades. Um agradecimento especial à professora Patrícia Machado Bueno Fernandes, minha orientadora, por todos os ensinamentos, pelas críticas, pelo apoio e acolhimento, sem os quais não estaria tão preparada e realizada profissionalmente. Um agradecimento especial também ao professor Antônio Alberto Fernandes, meu co-orientador, por querer e lutar para que eu seja sempre melhor em tudo que fizer. Também, ao professor Alexandre Santos, por toda a ajuda, as ideias e as críticas construtivas. Aos meus amigos Luiza Adami, Matheus Lage e Cárita Turbay, também componentes do LBAA, por toda a ajuda e por deixarem o ambiente de trabalho prazeroso e agradável.

Agradeço, com todo o meu coração, a meu pai Alvaro Luiz Santos pelo incentivo e cobrança aos estudos, os quais me permitiram chegar onde estou, a minha mãe, Marlene, as minhas tias Jane, Meiri, Penha e Lili e a minhas avós Luiza e Marilda que sempre me deram todo o apoio emocional e financeiro para que eu concluísse meu curso.

Finalmente, agradeço ao professor Fernando Araripe, membro externo da banca, pela disponibilizar seu tempo e conhecimento e pela sua dedicação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de produção do etanol de segunda geração produzido com a palha e o bagaço da cana de açúcar.....	15
Figura 2 – Arquitetura da parede celular contendo celulose, hemicelulose e lignina.....	21
Figura 3 – Células de <i>S. cerevisiae</i>	22
Figura 4: Delineamento experimental da produção do meio de cultura da casca de coco verde.....	27
Figura 5: Curva de crescimento de cepas industriais de <i>S. cerevisiae</i> em meio de cultura clássico laboratorial.....	34
Figura 6: Curva de crescimento de cepas industriais de <i>S. cerevisiae</i> em meio de cultura de hidrolisado de coco verde.....	35
Figura 7: Aglomeração de células de <i>S. cerevisiae</i>	37
Figura 8: Curva de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> em meio laboratorial.....	39
Figura 9: O crescimento da <i>S. cerevisiae</i> com disponibilidade de diferentes açúcares.....	40
Figura 10: Células de <i>S. cerevisiae</i> em meio de cultura clássico laboratorial.....	41
Figura 11: Células de <i>S. cerevisiae</i> em meio de cultura clássico laboratorial com glicose e xilose.....	42
Figura 12: Células de <i>S. cerevisiae</i> em meio de cultura clássico laboratorial contendo apenas pentose como açúcar: xilose.....	43
Figura 13: Curva de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> em meio de cultura de biomassa.....	45
Figura 14: A sobrevivência da levedura <i>S. cerevisiae</i> sob alta pressão hidrostática.....	46
Figura 15: Sobrevivência de cepas industriais e laboratoriais de <i>S. cerevisiae</i> sob alta pressão hidrostática.....	47
Figura 16: Avaliação da sobrevivência da cepa GM G2-104 sob seleção direcionada.....	49
Figura 17: Rotor da cápsula de HHP.....	50

Figura 18: A fermentação da cepa GM de <i>S. cerevisiae</i> sob seleção direcionada.....	52
Figura 19: A formação de bolhas causada pela fermentação da levedura <i>S. cerevisiae</i>	52
Figura 20: A mudança na conformação da unidade formadora de colônia da cepa G2-104 após seleção direcionada.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química da casca de coco verde. Fonte: HAN (1998), adaptado.....	19
Tabela 2: Avaliação da fermentação pelo método de pesagem.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

MMA – Ministério do Meio Ambiente
EUA – Estados Unidos da América
UE – União Europeia
PIB – Produto Interno Bruto
CENBIO – Centro Nacional de Referência em Biomassa
2G – Segunda Geração
NADH – Dinucleotídeo de Nicotinamina e Adenina Reduzido
NAD – Dinucleotídeo de Nicotinamina e Adenina
ATP – Adenosina Trifosfato
OGM – Organismo Geneticamente Modificado
HHP – Alta Pressão Hidrostática
GM – Geneticamente Modificado
PMC – Pó do Mesocarpo
YEPD – Yeast Extract Peptone Dextrose
D.O. – Densidade Óptica
Cu-Be – Cobre-Berílio
UFC – Unidade Formadora de Colônia
RPM – Rotações por Minuto
MPa – Mega Pascal
NM – Nanômetro
IDE – Integrated Development Environment

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 CENÁRIO MUNDIAL DE MUDANÇAS CLIMÁTICAS.....	13
1.2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	14
1.3 BIOMASSA: CASCA DE COCO VERDE.....	16
1.4 LEVEDURA: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E A FERMENTAÇÃO.....	19
1.5 ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA.....	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
3.2 HIDRÓLISE DA CASCA DE COCO VERDE.....	26
3.2.1 Produção do pó do mesocarpo	26
3.2.2 O pré-tratamento	26
3.2.3 Hidrólise Enzimática	27
3.3. LINHAGEM DE LEVEDURA UTILIZADA.....	28
3.4 CRESCIMENTO DA LEVEDURA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA COM DIFERENTES AÇÚCARES.....	28
3.5 TRATAMENTOS COM A ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA.....	29
3.5.1 Tratamento de 50 e 100 MPa por 30 minutos em diferentes cepas	29
3.5.2 Curva de Sobrevivência da Levedura sob Diferentes Valores de Pressão por	

30 minutos	29
3.5.3 Tratamento de 8 dias a 50 MPa da Cepa G2-04	30
3.5.4 Rotor de Cápsula de HHP	30
3.6 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO	32
3.6.1 Medição da concentração de açúcares por °brix refratométrico	32
3.6.2 Método de pesagem	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CEPAS INDUSTRIAIS DE <i>S. cerevisiae</i>	33
4.2 ANÁLISES LABORATORIAIS DO CRESCIMENTO DA CEPA G2-104	38
4.3 A SOBREVIVÊNCIA DA G2-104 SOB ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA	46
4.4 SELEÇÃO DIRECIONADA DE CEPA GM DE <i>S. cerevisiae</i>	48
4.5 AVALIAÇÃO DA MUDANÇA DE COMPORTAMENTO DA CEPA SOB SELEÇÃO DIRECIONADA COM MUDANÇA DE PROTOCOLO	51
4.6 CAPACIDADE FERMENTATIVA DA G2-104 APÓS A SELEÇÃO DIRECIONADA	53
5. CONCLUSÃO	55
6. PERSPECTIVAS	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

FAVARATO, L.. **ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA COMO FERRAMENTA DE SELEÇÃO DIRECIONADA EM *S. cerevisiae* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G PELA CASCA DE COCO VERDE.** 2019. 54f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

RESUMO

A casca de coco verde é um resíduo poluidor do meio ambiente gerado à toneladas no Brasil e que traz diversos problemas ambientais em seu descarte. Por isso, utilizá-lo para a produção de energia renovável é uma importante solução sustentável para a mitigação do impacto ambiental e para a geração de energia. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* representa um dos microrganismos mais empregados nas indústrias de fermentação para a produção de biocombustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos. Já existem no mercado cepas dessa levedura capazes de degradar resíduos lignocelulósicos, que vêm sendo desenvolvidas para aumentar o rendimento do processo, podendo tornar, este, viável financeiramente em escala industrial. A alta pressão hidrostática (HHP) é uma ferramenta que simula três tipos de estresses diferentes na levedura: o etílico, o térmico e o oxidativo, estresses esses que são muito comuns nas dornas de fermentação. Além disso, estudos comprovaram que a fermentação ocorre mais rapidamente quando a levedura se encontra sob HHP. Portanto, a HHP pode ser utilizada como ferramenta de seleção direcionada para se obter uma cepa com maior capacidade fermentativa e maior resistência aos estresses da fermentação, aumentando o rendimento do processo. Pretende-se, com este trabalho, aplicar uma pressão seletiva na cepa G2-104 de *S. cerevisiae*, utilizando-se da alta pressão hidrostática, a fim de se obter uma cepa com maior capacidade fermentativa em meio de cultura de casca de coco verde, para aumentar o rendimento do processo de produção do etanol de segunda geração.

Palavras chave: Etanol de segunda geração. Alta pressão hidrostática. Biocombustível. *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação. Casca de coco verde. Seleção direcionada.

FAVARATO, L.. **HIGH HYDROSTATIC PRESSURE AS A TOOL OF SELECTED DIRECTION IN *S. cerevisiae* FOR 2G ETHANOL PRODUCTION FROM GREEN COCONUT.** 2019. 54f. Dissertation - Post-Graduation Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo. Brazil.

ABSTRACT

The green coconut shell is a pollutant residue of the environment generated to tons in Brazil and that brings several environmental problems in its disposal. Therefore, using it for the production of renewable energy is an important sustainable solution for the mitigation of the environmental impact and for the generation of energy. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* represents one of the microorganisms most used in the fermentation industries for the production of biofuels from lignocellulolytic residues. There are already on the market strains of this yeast capable of degrading lignocellulolytic residues, which have been developed to increase the yield of the process, making it feasible financially on an industrial scale. The high pressure hydrostatic (HHP) is a tool that simulates three types of different stresses in the yeast: the ethyl, the thermal and the oxidative, which are very common in fermentation dornas. In addition, studies have shown that fermentation occurs more rapidly when the yeast is under HHP. Therefore, HHP can be used as a targeted selection tool to obtain a strain with higher fermentation capacity and greater resistance to fermentation stresses, increasing the yield of the process. The aim of this work was to apply a selective pressure to the *S. cerevisiae* strain G2-104 using high hydrostatic pressure in order to obtain a strain with a higher fermentation capacity in green coconut shell culture medium, to increase the yield of the second generation ethanol production process.

Keywords: Second generation ethanol. High pressure hydrostatic. Biofuel. *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentation. Coconut shell green. Targeted selection.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CENÁRIO MUNDIAL E MUDANÇAS CLIMÁTICAS

A vida moderna exige alta mobilidade e, como resultado, o transporte é um dos maiores e mais crescentes setores que demandam energia (LYND, 2017), há, aproximadamente, 1,2 bilhões de veículos motores sendo utilizados no mundo, uma média de 174 veículos por 1000 habitantes e mais de 60 milhões de veículos são produzidos anualmente (SOARES, 2016). Além disso, o aumento da automatização competitiva do agronegócio leva a uma alta demanda energética (SIMS *et al.*, 2015). Toda essa demanda energética gera um aumento na produção de gases poluentes pela utilização dos combustíveis fósseis, potencializando o aquecimento global.

Segundo a NASA, a Terra possui ciclos naturais de mudanças climáticas, que em sua maioria se devem às pequenas variações da órbita do planeta, acarretando na mudança de radiação solar recebida pela Terra. Apesar das mudanças naturais, a quantidade de dióxido de carbono presente na atmosfera nunca havia ultrapassado 300 partes por milhão, até o século XX. Atualmente, a quantidade de dióxido de carbono na atmosfera chega a 400 partes por milhão. Este gás, que é um dos gases responsáveis pelo efeito estufa, que é um fenômeno natural que mantém o planeta aquecido, quando em maior quantidade, pode ser responsável pelo aquecimento global. Já existem evidências deste aquecimento ocorrendo no planeta, como a elevação do nível do mar, o aquecimento e acidificação dos oceanos, o aumento da temperatura na terra, a diminuição do gelo nos polos, dentre outras. Por isso, há uma preocupação global com a emissão dos gases de efeito estufa e com as mudanças climáticas no planeta.

A Secretaria de Mudanças Climáticas e Qualidade Ambiental do MMA, afirma que o fomento às fontes renováveis de energia é uma das principais estratégias para o combate às mudanças climáticas, ao mesmo tempo em que

contribui para o desenvolvimento econômico e social do país em bases ambientalmente sustentáveis.

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente, o Brasil estabeleceu compromisso voluntário de redução das emissões de gases de efeito estufa e o setor de energia deverá participar desse esforço nacional, por meio do fomento às fontes renováveis de energia e do incremento da eficiência energética (MMA, 2019).

O Brasil, que é um país movido pelo agronegócio, é de suma importância neste cenário. Além disso, utilizar os resíduos como fonte de energia auxilia na redução do impacto ambiental. Portanto, o uso de biocombustíveis surge como uma alternativa promissora que está gradualmente se tornando viável técnica e economicamente (HAN-HAGERDAL *et al.*, 2008).

1.2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

O etanol é o principal biocombustível líquido utilizado nos meios de transporte. O etanol de primeira geração tem um processo de produção mais simples, utilizando açúcares ou grãos como matéria-prima (caldo de cana no Brasil e milho nos EUA e UE, por exemplo), enquanto o etanol 2G (bioetanol) tem etapas mais complexas de produção e utiliza material lignocelulósico (biomassa) como substrato (SAHA, 2017).

As biomassas lignocelulósicas têm em sua composição três constituintes principais: celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1). A celulose é um polímero linear e cristalino de estrutura rígida formada por unidades de β -(1 \rightarrow 4)-D-glicopirranose ligadas por ligações glicosídicas (β -1,4) de acordo com Olsson e Hahn-Hagerdal (1996 apud ROCHA; ALMEIDA; DA CRUZ, 2017). As unidades da fibra de β -(1 \rightarrow 4)-D-glicopirranose ficam acopladas de modo tal que grupos OH e CH₂OH ficam orientados equatorialmente formando cadeias lineares

(ROCHA; ALMEIDA; DA CRUZ, 2017). . A unidade de repetição do polímero de celulose consiste em duas unidades de glicose anidra, chamada de celobiose de acordo com Mohan et al., (2006 apud ROCHA; ALMEIDA; DA CRUZ, 2017).

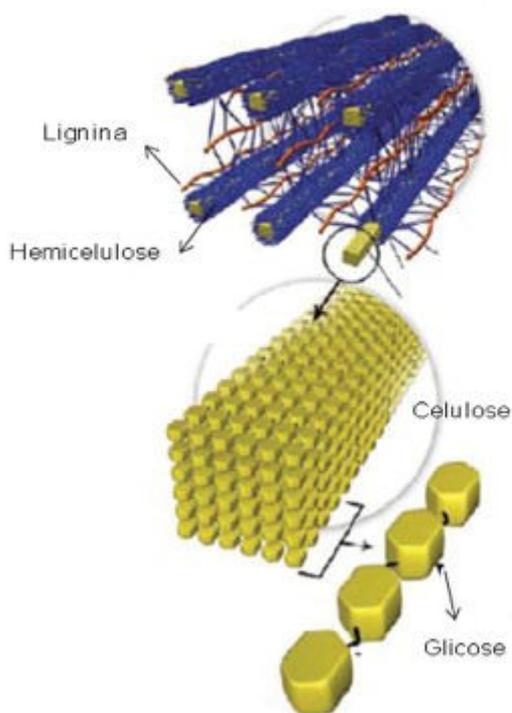


Figura 1: Arquitetura da parede celular contendo celulose, hemicelulose e lignina. Fonte: ALBUQUERQUE (2013).

O segundo constituinte, a hemicelulose, é composta de heteropolímeros ramificados e lineares como: L-arabinose, D-galactose, D-glicose, D-manose e D-xilose. Grupos metil e acetil encontram-se também ligados a sua cadeia de carbono Olsson; Hahn-Hagerdal (1996 apud ROCHA; ALMEIDA; DA CRUZ, 2017). A quantidade de hemicelulose varia conforme a origem do lignocelulósico (entre 25 a 35 %). Sua estrutura não é cristalina, e ao contrário da celulose, é facilmente hidrolisada. Xilose e arabinose são os dois principais monômeros de sua hidrólise (ROCHA; ALMEIDA; DA CRUZ, 2017).

Outro constituinte da biomassa é a lignina, cuja principal função é a sustentação do material lignocelulósico. Sendo a mesma formada por uma

complexa estrutura de polímeros amorfos, o que a torna hidrofóbica. Esse composto é capaz de auxiliar o transporte de água e o sequestro de carbono na planta (SOUZA, 2014).

Esses três principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina, formam uma matriz robusta, conferindo-lhe recalcitrância (baixa digestibilidade enzimática). Para a produção de bioetanol, a biomassa tem que ser submetida a um pré-tratamento para remover a lignina e a hemicelulose e suplantando a recalcitrância, aumentando a porosidade e reduzindo a cristalinidade da celulose, tornando-a disponível para a hidrólise. Um pré-tratamento efetivo deve retornar alta concentração de açúcar, mas sempre evitando sua perda e degradação; além de minimizar a formação de inibidores e fermentar sem a retirada destes inibidores para reduzir as etapas do processo e o consumo de água e de energia, a fim de mitigar os custos de produção (BOLIVAR-TELLERIA *et al.*, 2018; GALBI e ZACHI, 2012; SUN e CHENG, 2002 e; SUN *et al.*, 2016).

O custo estimado de produção do etanol de segunda geração gira em torno de R\$ 1,50 por litro, enquanto o custo de etanol de primeira geração é de, aproximadamente, R\$ 1,15. Até 2025, entretanto, o custo do etanol de segunda geração poderá cair para R\$ 0,75 por litro, podendo chegar, até 2030, a R\$ 0,52 (FAPESP, 2017).

Este cenário demonstra que há uma corrida para a produção de energias limpas, renováveis e que utilizem resíduos para sua produção. Isso possibilita, além da diminuição do despejo inadequado do lixo, a geração de uma fonte alternativa de energia, reduzindo a dependência dos combustíveis fósseis.

Para a produção do etanol de segunda geração, várias condições devem ser analisadas, como a escolha da biomassa, o tipo de pré-tratamento, as enzimas que serão utilizadas e as cepas da *S. cerevisiae* a serem escolhidas.

1.3 A BIOMASSA: CASCA DE COCO VERDE

Devido ao esgotamento de reservas combustíveis fósseis e a preocupação com as mudanças climáticas, novas fontes de energia renováveis e favoráveis ao meio ambiente começaram a ser exploradas (CHOUDHARY; SINGH; NAIN, 2016). Como resultado, os resíduos agrícolas se tornaram um elemento crítico do desenvolvimento sustentável, fazendo uma estreita ligação entre produção e consumo. A demanda de energia é suprida, principalmente, com combustíveis fósseis convencionais (38%), enquanto os biocombustíveis de resíduos têm apenas uma pequena contribuição (5.7%) (IEA, 2017).

O agronegócio brasileiro é uma atividade próspera, rentável e responsável por 23 a 24% do produto interno bruto (PIB) do país. O Brasil tem 388 milhões de hectares de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade, dos quais 90 milhões ainda não foram explorados (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017).

Alguns autores definem biomassa como qualquer material derivado da vida vegetal e que seja renovável em um período de tempo inferior a 100 anos (PROBSTEIN; HICKS, 1982; KLASS, 1998; FONSECA, 2009), e sendo assim, a maioria dos recursos energéticos como o petróleo, carvão mineral e xistos betuminosos não são considerados renováveis, apesar de serem derivados da vida vegetal.

Assim, do ponto de vista energético, o conceito geral abordado pelo CENBIO é que biomassa seria todo recurso renovável oriundo de matéria orgânica (de origem animal ou vegetal) que pode ser utilizado para produção de energia.

Cerca de 60% do peso total dos resíduos sólidos urbanos gerados no mundo são representados por materiais provenientes de recursos agroindustriais, como por exemplo, papel, papelão, madeira, folhas, galhos de árvores e uma vasta gama de resíduos agrícolas. Todos esses recursos podem ser usados na produção de compósitos baseados em fibras naturais (SPADOTTO; RIBEIRO, 2006).

Resíduos podem representar perda de biomassa e de nutrientes, além de aumentar o potencial poluidor associado à disposição inadequada que, além da poluição de solos e de corpos hídricos quando há lixiviação de compostos, acarreta problemas de saúde pública. Por outro lado, o elevado custo associado ao tratamento, ao transporte e à disposição final dos resíduos gerados tem efeito direto sobre o preço do produto final (ROSA et al., 2011).

Faz-se necessário, assim, destinar corretamente esses resíduos, que muitas vezes são despejados de forma inadequada. E, ainda melhor, utilizar esses para produção de energia, diminuindo o impacto ambiental, a utilização de combustível fóssil e gerando renda a partir de algo que seria lixo.

Uma etapa sensível para a produção do etanol 2G é a escolha da biomassa. As diversas fontes de biomassa possuem quantidades variáveis de açúcares e lignina, o que cria a necessidade de promover diferentes pré-tratamentos e hidrólise enzimática. Além disso, a abundância do resíduo deve ser levada em consideração, para que seja, de fato, viável economicamente.

A espécie *C. nucifera* é a única no gênero *Cocos*, pertencente à família *Arecaceae* (LIANG et al., 2014). No Brasil, duas espécies são amplamente cultivadas, *C. nucifera* var. *typica*, conhecida como variedade gigante, e *C. nucifera* var. *nana*, conhecida como variedade anã (BENASSI; FANTON; SANTANA, 2013). A primeira variedade introduzida no Brasil foi *C. nucifera* var. *typica*, variedade gigante, e atualmente é o cultivar utilizado na obtenção do coco seco. Já a variedade anã é utilizada para obtenção de água de coco. Há também os híbridos, obtidos do cruzamento entre as variedades, utilizados para ambas as aplicações (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014).

Aproximadamente 70% do lixo gerado nas praias do Nordeste é composto por cascas de coco verde (EMBRAPA, 2004). Este é um subproduto gerado pelo consumo da água de coco, depositado em lixões e acarretando problemas sociais, além de ser um desperdício de um material que possui um potencial para geração de energia.

A composição química da casca de coco verde é caracterizada por um alto teor de lignina, tornando difícil sua degradação no meio ambiente (Tabela 1), além de sua degradação gerar CH₄, que é um gás potencializador do efeito estufa, contribuindo para o aquecimento global e polui o lençol freático no local em que é degradado pela produção de um chorume tóxico.

Tabela 1 – Composição química da casca de coco verde. Fonte: HAN (1998), adaptado

Tipo de fibra de coco	Composição química (%)				
	Lignina	Glucose	L-Arabinose	Xilose	Manose
Pó	35,7	25,9	0,3	23,9	0
Fibra	33,5	34,9	0,05	17,0	0,12

1.4 A LEVEDURA: *Saccharomyces cerevisiae* E A FERMENTAÇÃO

Na linguagem cotidiana, o fermento é sinônimo de *Saccharomyces cerevisiae* - um nome dado a uma cepa de fermento descoberta no malte em 1837 - em conexão com a fabricação de cerveja. Esta noção imediatamente lembra que a levedura provavelmente é o organismo domesticado mais antigo - foi usado para a fabricação de cerveja já na Suméria e Babilônia em torno de 6000 aC. Em paralelo, as cepas de *S. cerevisiae* foram empregadas na produção de vinho na Geórgia e para a fermentação da massa no antigo Egito. No Egito, a cerveja era um refúgio comum, e presentes de cerveja eram concedidos a funcionários públicos e trabalhadores por serviços extraordinários. O nome científico "*Saccharomyces*" é derivado de uma palavra que significa "fungo de açúcar" em grego, enquanto a raiz de *cerevisiae* decorre de Ceres, o deus romano das culturas (FELDMANN et al., 2012).

O microrganismo *S. cerevisiae* é um fungo unicelular, que vêm sendo utilizado

por séculos por ser adaptada fisiologicamente às múltiplas condições de estresse impostas durante o processo de fermentação. Além disso, é largamente utilizado como um organismo modelo para o estudo dos efeitos de estresse em microrganismos (FERNANDES, 2005). Este organismo é utilizado na indústria da fermentação para a produção de cachaça, vinho, cerveja, pão e etanol. Por isso, é vastamente conhecido e possui seu genoma sequenciado.

Durante a fermentação de açúcares, as leveduras reoxidam NADH para NAD em dois passos, primeiro em que o piruvato é descarboxilado pela piruvato descarboxilase ao acetaldeído, seguido pela redução do acetaldeído catalisado por álcool desidrogenase. A regeneração de NAD é necessária para manter o equilíbrio redox e prevenir que se cesse a glicólise. Concomitantemente, o glicerol é gerado a partir do fosfato de dihidroxiacetona por dihidroxiacetona fosfato redutase para dar glicerol-3-fosfato como intermediário mais NAD para assegurar a produção deste composto. O glicerol-3-fosfato é então desfosforilado pela glicerol fosfatase (HOHMANN; MAGER, 2003).

No processo de fermentação alcoólica realizado pela levedura, uma molécula de glicose é quebrada em duas moléculas de ácido pirúvico. Cada molécula de ácido pirúvico gera uma molécula de gás carbônico e uma de etanol. Neste processo de quebra de glicose são produzidos quatro ATPs, porém, dois destes são utilizados, havendo um saldo final de aproximadamente 2 ATP, além de 2 moléculas de CO_2 , 2 de NADH_2 e 2 de etanol (Figura 2).

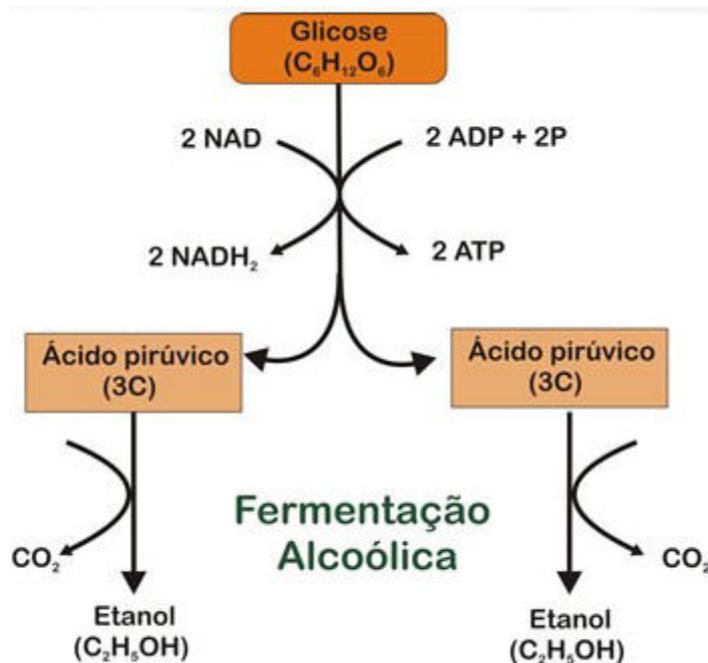


Figura 2 – Fermentação alcoólica.

Durante o processo fermentativo as leveduras são expostas a diversos tipos de estresses, como a pressão osmótica, causada pela alta concentração de sacarose; a temperatura elevada, pois a fermentação é um processo exotérmico, que gera energia, causando aumento de temperatura durante o processo de fermentação; o etanol, que apesar de ser produzido pelas leveduras também é considerado um estresse; e por último, a pressão hidrostática devido ao grande volume de líquido presente nas dornas de fermentação (BRAVIM, 2007).

Para que a produção de etanol seja realizada com maior produtividade, se faz necessária a escolha de um microrganismo específico para os açúcares e as condições ambientais impostas. Existem várias *cepas* da *S. cerevisiae*, dentre elas, industriais, comerciais e as selvagens. Há também as que entram no grupo dos OGM (Organismo Geneticamente Modificado), as quais possuem alguma alteração em seu gene.

Ao se tratar de produção de etanol de segunda geração, a necessidade de se

possuir uma levedura transformada é ainda maior. Isso, pois a *S. cerevisiae* é apenas capaz de degradar açúcares de seis carbonos, como a glicose e, se tratando de biomassa lignocelulósica, há grande quantidade de outros açúcares, como a xilose que possui cinco carbonos, não podendo ser utilizada pela levedura para a produção de etanol. Por isso, já existem no mercado leveduras capazes de fermentar açúcares de cinco carbonos, bem como selecionadas para melhor resistir aos inibidores da fermentação, como a cepa G2-104 (Figura 3), utilizada no presente trabalho.

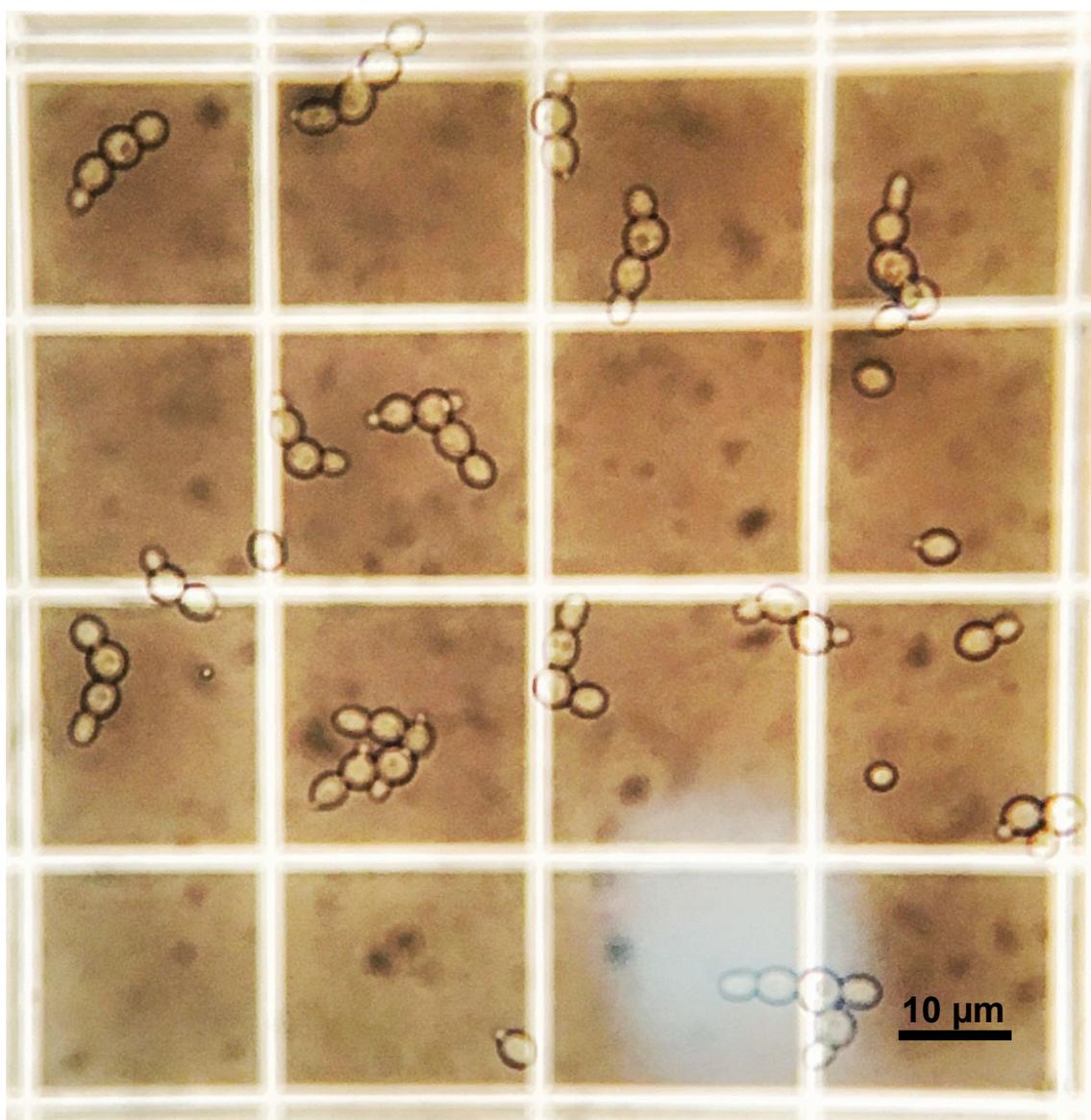


Figura 3: Células de *S. cerevisiae*. Células da cepa G2-104 observadas em microscopia óptica em uma concentração de $0,95 \times 10^7$.

1.5 A ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

A equação matemática que representa a pressão é:

$$P = \frac{F}{A}$$

Onde P representa a pressão, F representa a força normal aplicada à superfície e A é a área da superfície. Ou seja, A força aplicada em uma determinada superfície (em uma unidade de área), é chamada de pressão.

A pressão atmosférica varia muito na Terra. Em habitats terrestres, o valor da pressão diminui com o aumento da altitude e está próximo de 1 atm (0.101325 MPa) ao nível do mar, enquanto nos oceanos, quanto maior a profundidade, maior a pressão. Além disso, a maioria dos organismos vivos está abaixo de 1000 m (Figura 3), esses organismos que vivem sob alta pressão são denominados piezófilos (SOMERO, 1992; RIVALAIN *et al.*, 2010; BOLIVAR-TELLERIA, 2018).

A alta pressão hidrostática (HHP) é um tipo único de estresse, uma vez que o efeito que desencadeia é causado apenas por uma mudança no volume do sistema. Além disso, é importante considerar que quando a HHP é aplicada, as reações bioquímicas são seguidas por alterações volumétricas; portanto, se uma reação é acoplada a um aumento no volume, ela será inibida pelo HHP e, quando associada a uma diminuição no volume, pode ser aumentada (MONTRE, 2001; PALHANO *et al.*, 2004).

Os diversos efeitos da HHP influenciam muitos processos em sistemas biológicos, como crescimento, divisão e viabilidade celular. Dependendo da quantidade e do tempo em que a HHP é aplicada, a pressão atua inibindo ou retardando as atividades citocinéticas e mitóticas nas células em divisão. Dessa forma, a conformação, estabilidade, polimerização e despolimerização

de proteínas mitóticas são afetadas pela alta pressão, além de induzir embalagens lipídicas, o que leva a uma redução na fluidez da membrana (FERNANDES, 2008; TOSI-COSTA *et al.*, 2018).

A 50 MPa, a parada do ciclo celular é induzida, mas é um efeito subletal e não afeta a morfologia da célula (ABE, 1995; ABE, HORIKOSHI, 2000; PALHANO *et al.*, 2004). Em pressões superiores a 100 MPa são observados efeitos morfológicos e fisiológicos significativos em leveduras, já a perda da viabilidade celular ocorre em pressões acima de 200 MPa (KOBORI *et al.*, 1995; FERNANDES, PANEK, KURTENBACH, 1997). Um aumento da taxa de rendimento para a produção de etanol é observado após pressurização de 10 MPa, mas pressão mais alta pode levar a um efeito oposto, interrompendo a fermentação alcoólica quando sob pressões acima de 87 MPa são aplicadas (PICARD *et al.*, 2007).

Conhecendo o potencial biotecnológico da alta pressão hidrostática e como ela afeta a fisiologia e a expressão gênica dos microrganismos, utilizá-la como ferramenta de seleção direcionada, pode aumentar a capacidade fermentativa de *S. cerevisiae* no meio da casca de coco verde, uma vez que as biomassas lignocelulósicas, apesar de apresentarem em sua composição a lignina, a celulose e a hemicelulose, diferem entre si na quantidade de cada componente. Além disso, os processos de quebra da matrix lignocelulósica geram inibidores em diferentes concentrações. Por isso, uma cepa desenvolvida para uma biomassa específica, pode não ter o mesmo desempenho em outra biomassa.

Apesar das cepas G2-104 e GSE16-T18 de *S. cerevisiae* serem fermentadoras de materiais lignocelulósicos, são cepas provindas da Bélgica, desenvolvidas especificamente para utilizar resíduos florestais para a produção do etanol de segunda geração. No presente trabalho, a biomassa utilizada é a casca de coco verde e, por isso, a cepa não possui a mesma capacidade fermentativa apresentada no meio de resíduo florestal.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Induzir aumento na produção de etanol de segunda geração em linhagem de levedura geneticamente modificada (GM) submetida ao tratamento de alta pressão hidrostática em hidrolisado de coco verde.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Hidrolisar e sacarificar a casca de coco verde;
2. Estabelecer a curva de crescimento da linhagem de levedura G2-104 em diferentes meios de cultura;
3. Analisar a sobrevivência da linhagem GM submetida aos tratamentos de pressão de 50, 100, 150 e 200 MPa por 30 minutos;
4. Submeter as células de levedura a 50 MPa por 8 dias a fim de avaliar a sobrevivência;
5. Avaliar a eficiência fermentativa da linhagem GM após o piezotratamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Buscando por publicações recentes, como atualizações de protocolos e/ou novas informações relacionados ao tema do presente artigo, realizou-se periodicamente buscas nas plataformas Web of Science, PubMed e Periódicos Capes.

3.2 HIDRÓLISE DA CASCA DE COCO VERDE

3.2.1 Produção do Pó do Mesocarpo

Frutos de coco verde foram fornecidos pelos comerciantes de Vila Velha/ES, Brasil. Os frutos foram lavados externamente com água da torneira, o mesocarpo foi extraído manualmente com uma faca dentada de aço inoxidável e a biomassa reduzida a pequenas lascas. O mesocarpo foi seco a 105 °C em estufa até que a umidade se encontrou menor que 5% (w/w). Depois de seco, o mesocarpo foi moído no moinho de disco vibratório de aço temperado por 90 segundos a uma velocidade de 1100 rpm. Em seguida, o pó foi peneirado utilizando-se uma peneira de 212 micrômetros e armazenado na geladeira de forma a se manter a 4 °C.

3.2.2 O Pré-tratamento

Para o preparo do meio da casca de coco verde, o pó do mesocarpo do coco (PMC) foi misturado com uma solução de NaOH [1,0 g/L] em uma proporção de 1:18 (PMC/solução de NaOH) (figura 4 - 1). O frasco foi mantido a 25 °C e 200 rpm por 1 hora. A solução formada foi neutralizada com o uso de H₂SO₄ concentrado e o pH ajustado para 5,0. Adicionou-se uma solução tampão de citrato (2,5 M) em uma proporção de 20 mL de solução tampão/1 L (figura 4 - 1 e 2) de pré-tratado de coco. Para redução dos inibidores gerados nesses processos, acrescentou-se 0,05g de PEG4000 ao meio, que foi mantido por 2 horas a 50 °C e 200 rpm (figura 4 – 2).

3.2.3 Hidrólise Enzimática

Utilizou-se o coquetel enzimático Cellic® CTec 2 (celobiohidrolase I, endoglucanase I e β-glicosidade) da Novozymes com uma dosagem de 0,05-0,50% w/w (g enzima/g celulose). A sacarificação ocorreu por 24 horas a 50 °C e 200 rpm (figura 4 - 3). O meio foi então filtrado à vácuo e autoclavado. Após isso, acrescentou-se 2 g/L de ureia ao meio de cultura, como fonte de nitrogênio, conforme descrito por Soares *et al.* (2016), e o meio de cultura obtido foi armazenado a 4 °C.

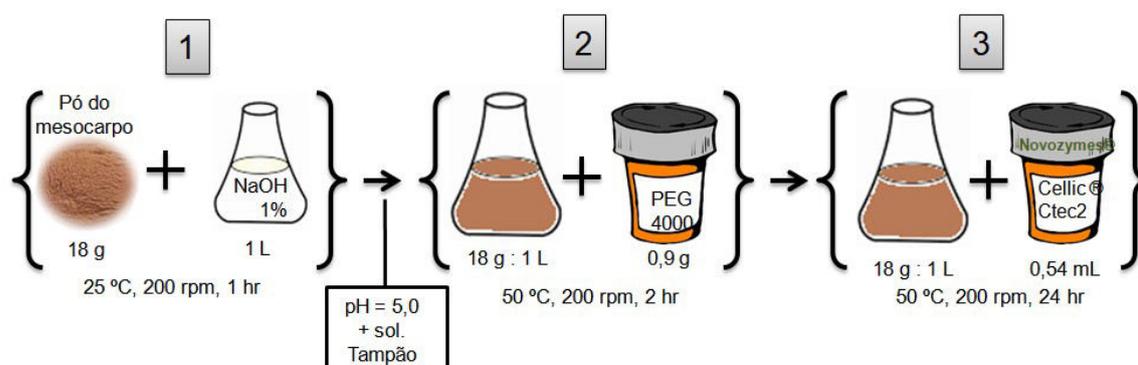


Figura 4: Delineamento experimental da produção do meio de cultura da casca de coco verde. 1 – Pré- tratamento; 2 – Diminuição de inibidores e; 3 – Hidrólise enzimática.

3.3 LINHAGEM DE LEVEDURA UTILIZADA

Foi utilizado no presente trabalho a linhagem de levedura G2-104 (Laboratory of Molecular Cell Biology, KU Leuven, Belgium) obtida a partir de modificação genética para degradação de xilose, além de melhor suportar os inibidores da fermentação do etanol de segunda geração. Portanto, a cepa selecionada possui características desejadas para a degradação de resíduos lignocelulósicos.

3.4 CRESCIMENTO DA LEVEDURA EM MEIOS DE CULTURA COM DIFERENTES AÇÚCARES

Foram utilizados os açúcares xilose e glicose para avaliar a utilização dos açúcares pela levedura. A linhagem foi crescida a 28 °C com agitação (160 rpm) em meio de cultura YEPD (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose), meio de cultura YEPX (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% xilose), meio de cultura YEPD/X (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1% glicose e 1% xilose) e em meio de casca de coco verde. A curva de crescimento foi avaliada utilizando-se do leitor de microplacas Synergy™ HT Multi-Detection Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT) e utilizando-se o Software Gen5™ onde a leitura da D.O. $_{600\text{ nm}}$ foi realizada a cada 30 minutos, obtendo-se, assim, a curva de crescimento dessa cepa para cada meio de cultura.

3.5 TRATAMENTOS COM A ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Para todos os tratamentos com alta pressão hidrostática, as amostras foram colocadas em um tubo de teflon de 14 mL e pressurizadas na ausência de ar à temperatura ambiente. A alta pressão hidrostática foi aplicada em um cilindro de Cu-Be e um manômetro manual foi utilizado para aplicar a pressão. Após os tratamentos, as cepas foram plaqueadas para avaliar a sobrevivência. Para o plaqueamento, as amostras foram diluídas 10.000 vezes e mantidas por 48 horas na estufa para crescimento das colônias. Estas Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram contadas ao final das 48 horas na estufa.

3.5.1 Tratamento de 50 e 100 MPa por 30 minutos em diferentes cepas

As linhagens Ethanol Red, G2-104, PEDRA e S288C foram crescidas a 28 °C com agitação (160 rpm) em meio YEPD (YEPDX para a G2-104) até a fase exponencial de crescimento ($D.O._{600\text{ nm}} = 1,0$). Após o crescimento, as culturas foram a tratamentos de 50 e 100 MPa por 30 minutos. Após o tratamento, avaliou-se a sobrevivência das células por plaqueamento.

3.5.2 Curva de Sobrevivência da Levedura Sob Diferentes Valores de Pressão por 30 minutos

A linhagem de *S. cerevisiae* G2-104 foi crescida a 28 °C com agitação (160 rpm) em meio YEPDX até a fase exponencial de crescimento ($D.O._{600\text{ nm}} = 1,0$). Após o crescimento, a cultura da G2-104 foi submetida a tratamentos de 50,

100, 150 e 200 MPa por 30 minutos. Após o tratamento, avaliou-se a sobrevivência das células por plaqueamento.

3.5.3 Tratamento de 8 dias a 50 MPa da Cepa G2-104

Para o tratamento de pressão prolongado, a linhagem cresceu a 28 °C com agitação (160 rpm) em meio de coco até a fase exponencial de crescimento ($D.O_{600nm} = 1,0$). Após, o meio de coco foi renovado e as células foram submetidas ao tratamento de 50 MPa por 8 dias. A cápsula de pressão foi mantida em um equipamento de fabricação própria que foi denominado “Rotor de Cápsula de HHP”. Ao final dos 8 dias, uma amostra para avaliação da fermentação foi retirada e uma outra amostra foi retirada para o plaqueamento.

3.5.4 Rotor de Cápsula de HHP

O novo equipamento foi desenvolvido por Alvaro Luiz Santos, Alvaro Favarato Santos e Luiza Favarato Santos e tem como objetivo agitar as células levemente, evitando sua sedimentação. Para a confecção do equipamento os materiais utilizados foram:

- 04 mancais com 02 eixos de 2 mm x 500 mm;
- 04 rodas com revestimento de borracha de aproximadamente 04 polegadas de diâmetro;
- 02 rolamentos de 01 polegada;
- Barra roscada de ½ polegada com diversas porcas;
- Cantoneira de 1 polegada;
- Parafusos diversos;

- Motor de automatização de portão 220 v (usado);
- Arduíno;
- Transformador de 110 v para 220 v;
- Solda de eletrodo revestido;
- Compensado de 20 mm;
- Fita adesiva de borracha.

As 04 rodas de borracha tiveram seus furos abertos para 20 mm de forma levemente excêntricas a fim de proporcionar um leve balanço durante a rotação do cilindro. As rodas foram afixadas nos eixos dos mancais, por meio de parafusos fixados em furos feitos nos eixos dos mancais. Os mancais foram fixados em cantoneiras paralelamente, de tal forma que a distância entre as extremidades das rodas neles fixadas não ultrapassassem o diâmetro total do cilindro de Cu-Be. As cantoneiras foram soldadas em outras 02 transversais e fixadas em uma peça de compensado naval que recebeu em sua parte inferior fitas de borracha promovendo estabilidade ao sistema. A um dos eixos, foi acoplado o motor de portão, utilizado por já conter uma redutora, promovendo ao sistema uma velocidade de rotação inferior a 30 rpm. Foram instalados rolamentos limitadores no sistema posicionados próximos as extremidades do cilindro de Cu-Be, a fim de evitar sua fuga durante a rotação e agitação.

Utilizando-se de um ARDUÍNO programado através do IDE, foi possível criar um mecanismo de acionamento do sistema a cada 30 minutos: rotação por 30 segundos para a direita, 10 segundos de parada e rotação por mais 30 segundos para a esquerda. Com a leve descentralização das rodas de borracha, o sistema além de girar o cilindro, promove um leve balanço no eixo longitudinal do cilindro, fazendo com que haja uma maior homogeneidade de dispersão no meio de cultura.

3.6 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO

3.6.1 Medição da Concentração de Açúcares por °Brix Refratométrico

O instrumento utilizado para medir a concentração de soluções aquosas foi o refratômetro. Brix (símbolo °Bx) é uma escala numérica usada para medir a quantidade de sólidos solúveis em uma solução. A escala Brix é utilizada na indústria de alimentos para medir a quantidade aproximada de açúcares em sucos de fruta, vinhos e na indústria de açúcar.

3.6.2 Método de Pesagem

Na fermentação, o consumo de glicose e a geração de CO_2 em forma de gás, faz com que haja perda de peso do meio em que o organismo fermentador se encontra. Por isso, foi utilizado o método de pesagem para prever a fermentação da levedura. Para tal, as amostras foram pesadas na hora 0 do experimento e ao final do experimento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CEPAS INDUSTRIAIS DE *S. cerevisiae*

A Ethanol Red e PEDRA são cepas industriais especializadas para produção de etanol de primeira geração, já a GSE16-T18 e G2-104 são cepas industriais especializadas para produção do etanol de segunda geração e são geneticamente modificadas para utilizar a xilose, além de serem resistentes aos inibidores dos meios de cultura lignocelulósicos. Para avaliar essas cepas em condições ótimas, utilizou-se um meio de cultura clássico laboratorial, que possui todos os nutrientes necessários para o crescimento de *S. cerevisiae*, o YEPD e, utilizando-se de um leitor de microplacas e do programa Gen5, obteve-se uma curva de crescimento (Figura 4). As cepas também foram avaliadas em meio de casca de coco verde (Figura 5), para que fosse analisada a diferença no crescimento das cepas de primeira e de segunda geração. A curva de crescimento em meio YEPD é realizada com o objetivo de se obter as características da levedura em condições ótimas, como o tempo de sua fase Lag, sua fase exponencial (Log), sua fase estacionária, para que o tempo de crescimento do organismo seja definido até chegar a fase em que se deseja trabalhar e realizar os experimentos. Além disso, permite entender o seu tempo de adaptação, de estágio latente, mesmo em condições ideais, quando o microrganismo começa a se multiplicar e utilizar os recursos do meio e após quanto tempo este já consumiu os nutrientes e produziu subprodutos tóxicos para sua própria população, entrando em uma fase estacionária, onde o número de mortes é igual ao número de organismos novos, mantendo um número constante de células. A última fase do microrganismo é a fase de declínio, onde o meio se torna tóxico e não mais há nutrientes disponíveis e sua população começa a morrer. Essa última fase não foi avaliada no experimento, pois não se pretende estudá-la.

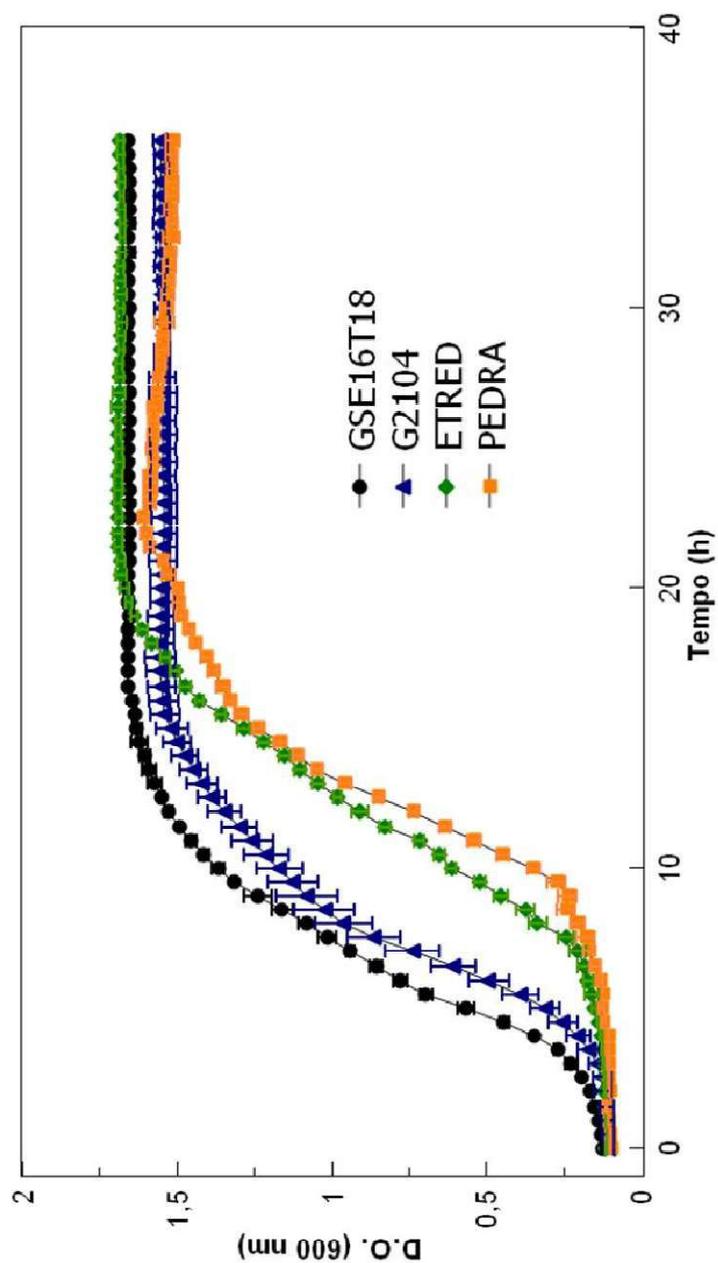


Figura 5: Curva de crescimento de cepas industriais de *S. cerevisiae* em meio de cultura clássico laboratorial. Foram utilizadas as cepas GSE16-T18, PEDRA, Ethanol Red e G2-104 em meio YEPD e o experimento durou 36 horas. O eixo Y representa a densidade óptica lida em 600 nm pelo leitor de microplacas Synergy™ HT Multi-Detection Reader e o eixo X representa o tempo em horas.

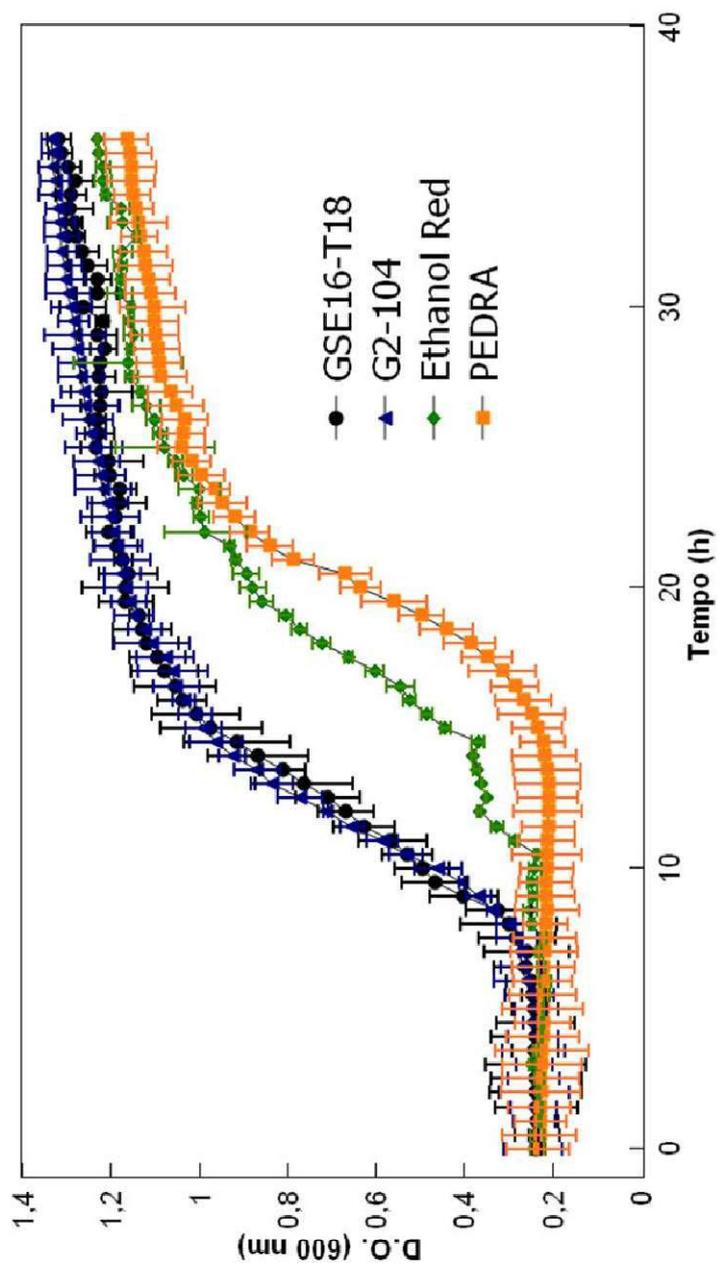


Figura 6: Curva de crescimento de cepas industriais de *S. cerevisiae* em meio de cultura de hidrolisado de coco verde. Foram utilizadas as cepas GSE16-T18, PEDRA, Ethanol Red e G2-104 e o experimento durou 36 horas. O eixo Y representa a densidade óptica lida em 600 nm pelo leitor de microplacas Synergy™ HT Multi-Detection Reader e o eixo Y representa o tempo em horas.

Na figura 4, as células estão em meio laboratorial YEPD e as cepas produtoras de etanol de segunda geração (CPE2G) possuem uma fase Lag mais curta, de aproximadamente 3 horas. Quando sua fase (Log) começa, com uma duração de 8 horas. Após 12 horas de crescimento, as CPE2G entram em sua fase estacionária, perdurando até o final do experimento (36 horas) com uma concentração de células estável. As cepas produtoras de etanol de primeira geração (CPE1G) se mantêm 8 horas na fase Lag e 12 horas na fase Log, entrando na fase estacionária após 20 horas de crescimento, mantendo constante concentração de células. Apesar da diferença em sua fase Lag, as CPE1G e CPE2G apresentam uma curva de crescimento semelhante, o que é esperado levando em consideração o fato do meio de cultura laboratorial YEPD ter as condições ideais para o crescimento da *S. cerevisiae*. Através deste experimento, foi possível estabelecer um protocolo para a utilização de cada levedura.

A figura 5 apresenta o crescimento das CPE1G e CPE2G em meio de cultura de hidrolisado de casca de coco verde. Nesta, as CPE1G apresentam uma fase Lag de aproximadamente 17 horas, enquanto que as CPE2G apresentam fase Lag de 9 horas. A fase Lag é a fase de adaptação do microrganismo ao meio em que se encontra. Por isso, é esperado que nos meios de cultura de materiais lignocelulósicos, as cepas que não são específicas para tal apresentem uma fase Lag maior, como as CPE1G, uma vez que esse meio de cultura possui diversos inibidores e diferentes concentrações de açúcares. As outras duas cepas utilizadas no presente trabalho, apesar de serem específicas para produção de etanol de segunda geração, portanto específicas para materiais lignocelulósicos, foram desenvolvidas para um material específico: o meio de cultura do resíduo florestal. Por isso, os inibidores e concentrações de açúcar diferem do meio para o qual elas foram desenvolvidas para o meio no qual estão sendo submetidas. Por isso, apresentam uma fase Lag maior nesse meio, que não possui todas as condições ideais para seu crescimento. A fase Log das CPE1G é de 8 horas, contra 10 horas das CPE2G, quando ambas passam a não mais ter seu crescimento em progressão geométrica, porém continuam com uma pequena taxa de crescimento. Além disso, ao final do

experimento, as CPE2G possuem maior densidade óptica e, portanto, maior concentração de células. O melhor desenvolvimento das CPE2G se deve à sua especificidade em materiais lignocelulósicos além da utilização da xilose. Ademais, o meio de cultura YEPD possui concentração de açúcar de 5 °Brix, enquanto o meio de hidrolisado de coco possui 11 °Brix. Essa grande quantidade de açúcar também pode causar um estresse osmótico na levedura. Porém, ambas CPE1G e CPE2G estão adaptadas a esse tipo de estresse, uma vez que a cana de açúcar, por exemplo, possui 18 °Brix e é o meio utilizado na indústria com a cepa PEDRA para a produção do etanol 1G. Portanto, apesar de ser um estresse presente, essas cepas já estão adaptadas a essa condição.

Apesar das CPE2G terem tido a mesma desenvoltura no meio de hidrolisado, a cepa GSE16-T18 apresentou uma condição problemática: a aglomeração. Mesmo submetendo as células ao banho ultrassônico e a químicos como tentativa de desaglomerá-las, as células permaneceram (Figura 6), mesmo depois de mortas.

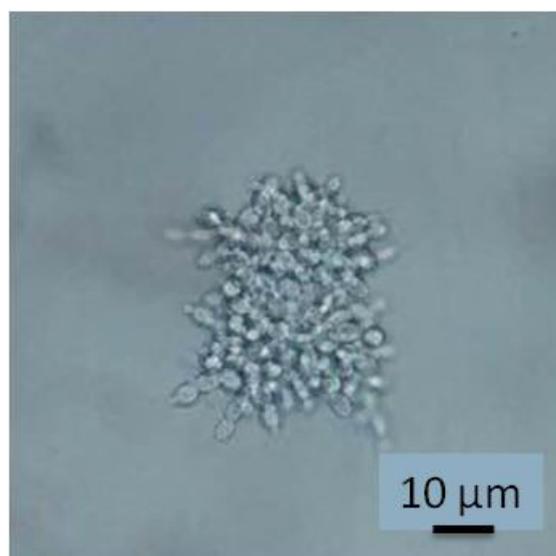


Figura 7: Aglomeração de células de *S. cerevisiae*. Na figura, a cepa GSE16-T18 após o banho ultrassônico, ainda apresentando aglomeração. Não se conhece a concentração de células no meio, uma vez que não foi possível contar as células.

A aglomeração se torna um problema para os experimentos laboratoriais, uma vez que contar as células se torna impraticável, além das dificuldades para a leitura da densidade óptica. Também, na indústria do álcool, essa característica não é positiva. Quando as células formam um aglomerado, somente as células que estão na parte externa tem contato com os açúcares, e, sendo assim, só elas fermentam, reduzindo o rendimento do processo. Por isso, a cepa escolhida para o presente trabalho foi a cepa G2-104.

4.2 ANÁLISES LABORATORIAIS DO CRESCIMENTO DA CEPA G2-104

A cepa GM de *S. cerevisiae* G2-104 passou por diversas análises laboratoriais de crescimento em diferentes meios de cultura. Para que sua curva de crescimento em meio clássico laboratorial YEPD fosse analisada separadamente, o experimento foi repetido, utilizando-se, também do leitor de microplacas e do programa Gen5, porém por 54 horas (figura 7).

Como no experimento anterior, a cepa possui uma fase Lag de ~ 3 horas e uma fase de Log de 8 horas, entrando, após isso, em sua fase estacionária, que perdura até o final do experimento, por 43 horas. O fato da cepa não ter apresentado a fase de declínio em 54 horas de experimento demonstra sua capacidade de sobreviver mesmo em meio com diversos compostos tóxicos.

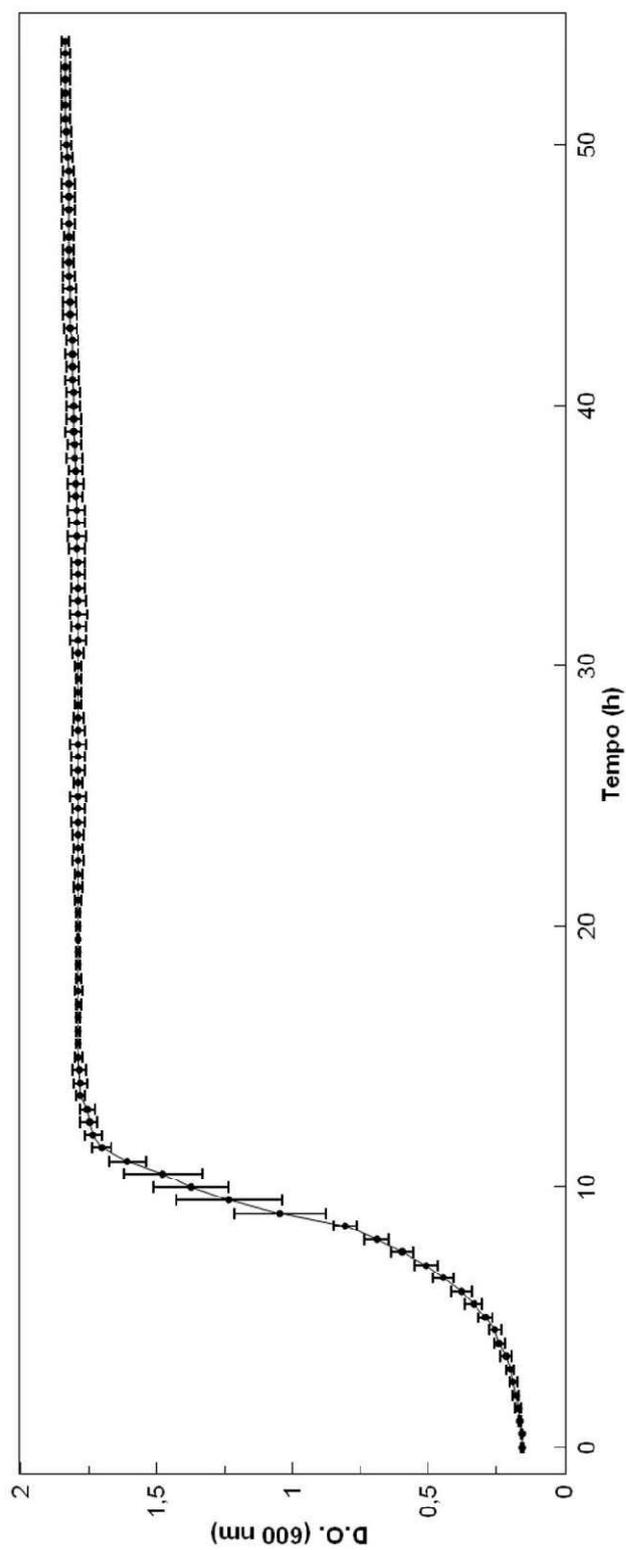


Figura 8: Curva de crescimento da levedura *S. cerevisiae* em meio laboratorial. Cepa G2-104 em meio YEPD por 54 horas. O eixo Y representa a densidade óptica (concentração) lida em 600 nm) e o eixo X representa o tempo em horas.

A G2-104 além de utilizar a glicose, é geneticamente modificada para a utilização da xilose. Por isso, a cepa foi crescida em meios clássicos laboratoriais com modificação na quantidade e tipo de açúcar. Os meios utilizados forem o YEPD, YEPDX e YEPX. No meio YEPDX a quantidade de dextrose, que naturalmente seria 20 g/L, foi de 10 g/L, acrescentando-se 10 g/L de xilose, por isso o nome YEPDX. No meio YEPX, ao invés de utilizar dextrose, utiliza-se 20 g/L de xilose (Figura 9). O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a utilização da xilose pela levedura, além de estabelecer um protocolo de crescimento em um meio onde ela melhor se desenvolve. Também, manter a levedura em um meio com xilose é importante para que esta não diminua ou perca sua capacidade de utilizá-la.

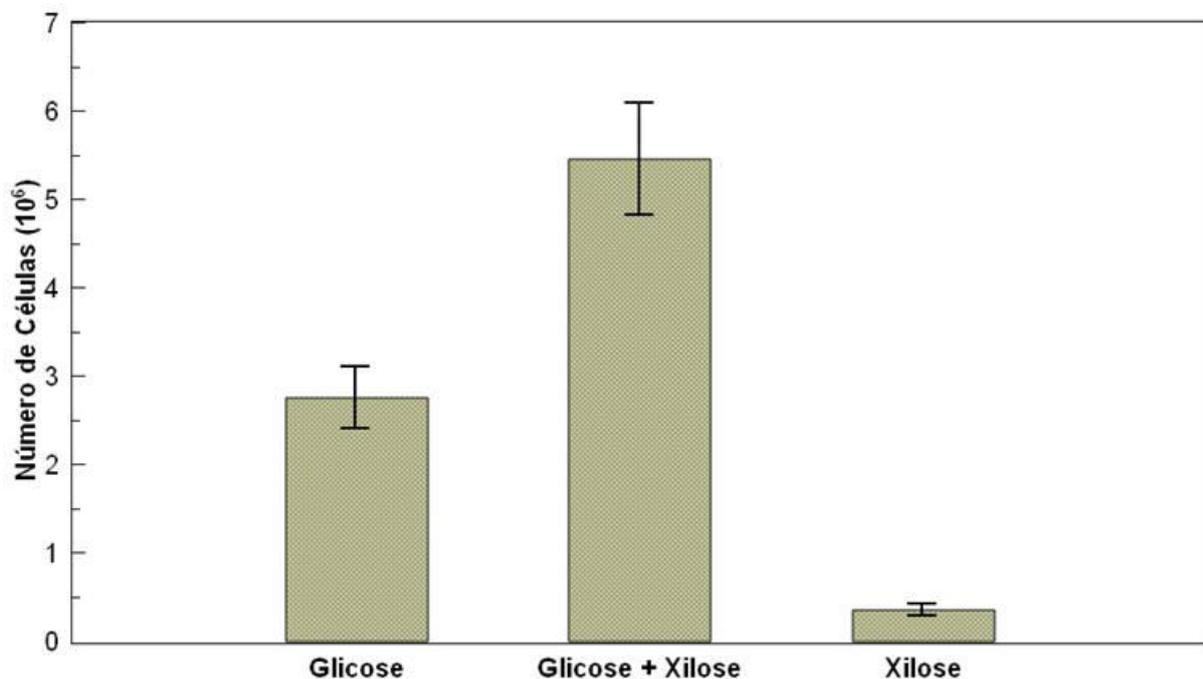


Figura 9: O crescimento da *S. cerevisiae* com disponibilidade de diferentes açúcares. Número de células da cepa G2-104 em meios de cultura com diferentes açúcares: glicose apenas, glicose e xilose e xilose apenas. O eixo Y representa o número de células e o eixo X os diferentes tratamentos

O meio em que houve maior crescimento da cepa foi o meio YEPDX, seguido pelo meio YEPD e, por último, o meio YEPX. Isso demonstra a preferência da cepa por um meio de cultura com os dois açúcares, a glicose e a xilose. Apesar de ter menor crescimento, a cepa possui um crescimento mediano em um meio que só possui glicose e um crescimento ainda menor em um meio apenas com xilose, por essa não ser sua via de utilização principal.

Além disso, as células da levedura foram observadas em microscópio óptico nos meios YEPD (Figura 9), YEPDX (Figura 10) e YEPX (Figura 11), sem diluição alguma.

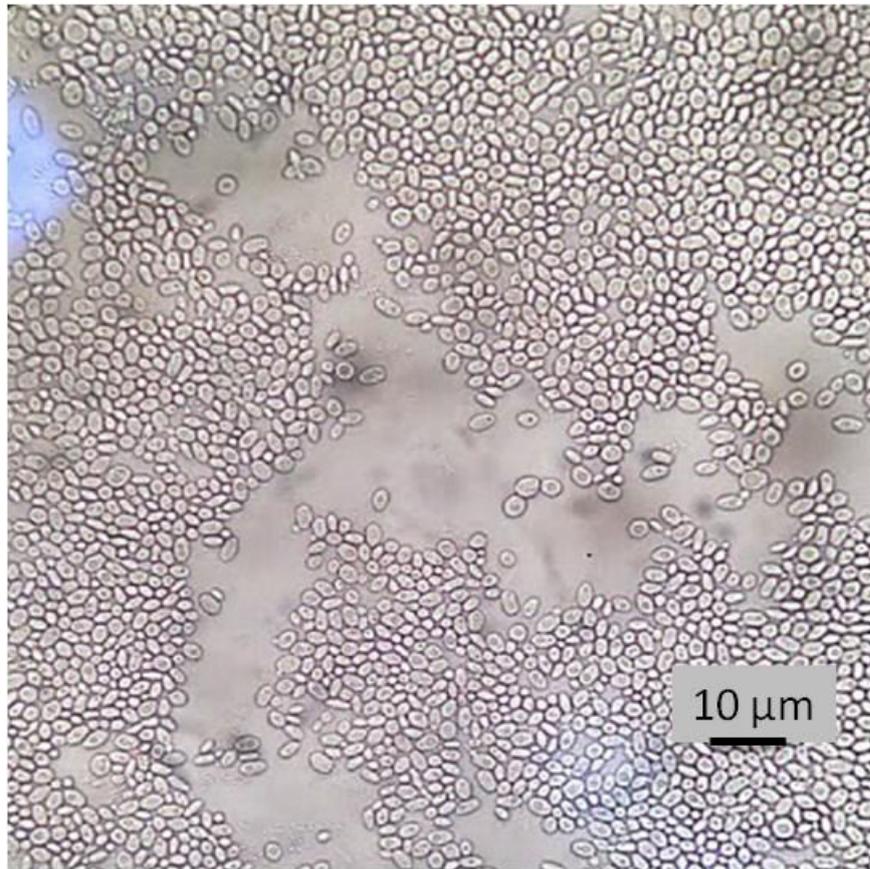


Figura10: Células de *S. cerevisiae* em meio de cultura clássico laboratorial. As células da cepa G2-104 foram observadas por microscopia óptica após 24 horas de crescimento em meio YEPD contendo glicose como fonte de carbono.

Na figura 10, pôde-se observar uma concentração de $2,5 \times 10^6$ células. Além disso, as células possuem um formato ovalado e algumas apresentam brotamento. Também, percebe-se a diferença de tamanho das células mãe, que são maiores, para as células filha, menores. Apesar da grande maioria das células apresentar formato ovalado, algumas são arredondadas. Quando em sua fase Log, a população pode apresentar diferentes tamanhos e formatos, uma vez que a taxa de divisão celular é muito alta e existem células novas, velhas e células mortas.

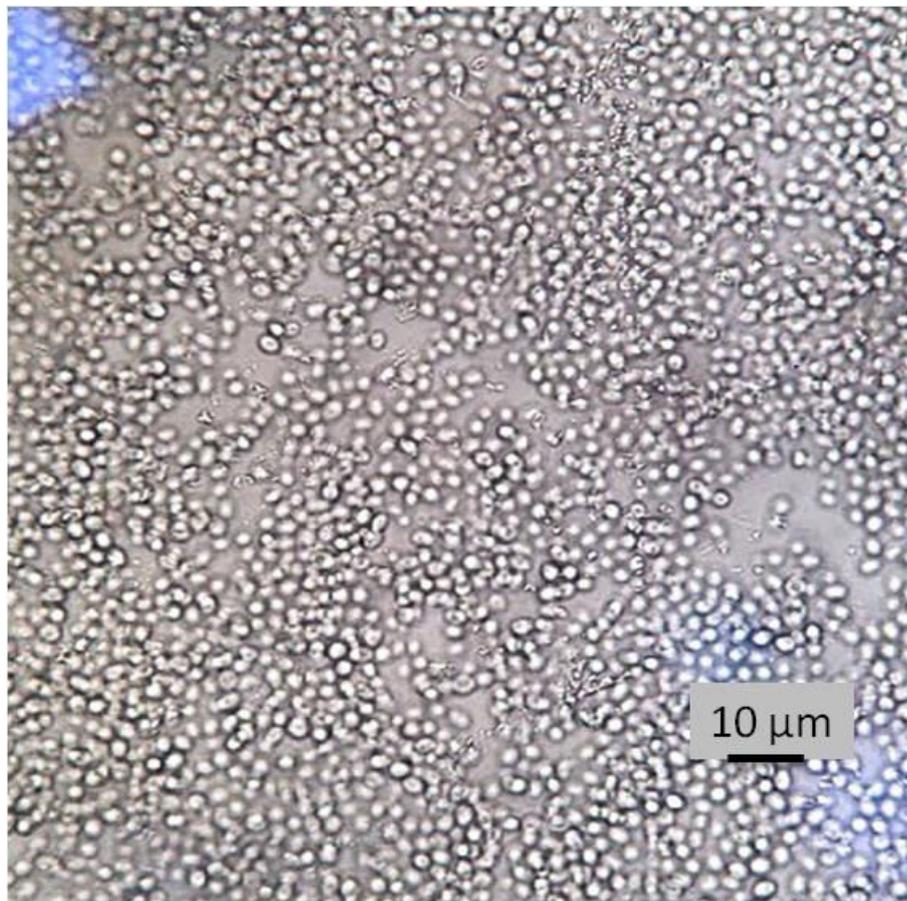


Figura 11: Células de *S. cerevisiae* em meio de cultura clássico laboratorial com glicose e xilose. As células da cepa G2-104 foram observadas por microscopia óptica após 24 horas de crescimento em meio YEPDX contendo glicose e xilose como fonte de carbono.

A figura 11 apresentou uma elevada concentração de células: $5,0 \times 10^6$. Por isso, há uma sobreposição de células, o que dificulta a visualização. Apesar disso, pode-se observar que poucas células apresentam brotamento e a maioria possui o mesmo tamanho médio. Por estar em um meio com as condições ideais e os açúcares que a cepa utiliza, essa chegou à fase estacionária em menos tempo. Na fase estacionária, a quantidade de células que morre é a mesma de células novas e a divisão celular ocorre em uma taxa menor.

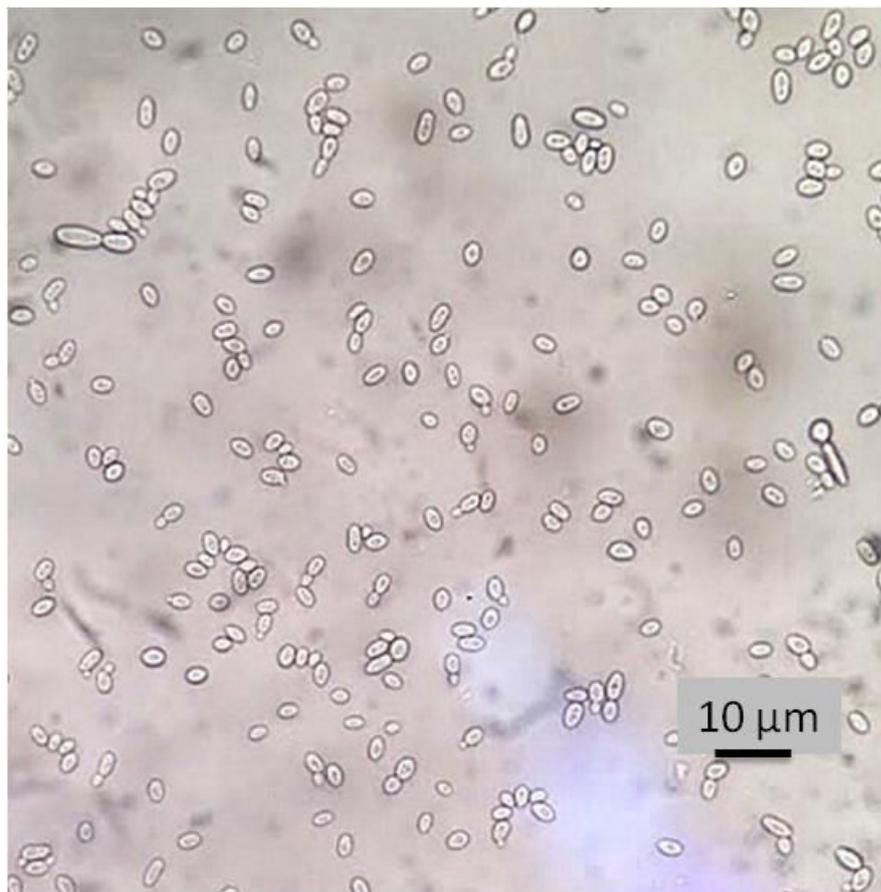


Figura 12: Células de *S. cerevisiae* em meio de cultura clássico laboratorial contendo apenas pentose como açúcar: a xilose. As células da cepa G2-104 foram observadas por microscopia óptica após 24 horas de crescimento em meio YEPX contendo xilose como fonte de carbono.

Como demonstrado na figura 12, em meio YEPX, a concentração de células foi menor, quando comparado com os meios YEPD e YEPDX: $0,3 \times 10^6$. Ademais, as células apresentam formatos diversos, mas a maioria é oval. Também, as células diferem muito em tamanho, sendo algumas pequenas e outras bem grandes. Algumas células apresentam brotamento, mas não em grande quantidade, o que demonstra que a população está entrando na fase Log. Isso significa que a cepa passou muito tempo na fase Lag. A via principal é a da glicose, apesar da cepa também apresentar a via de utilização da xilose. Quando um organismo possui duas vias de utilização de fonte de carbono para produção de energia, é comum não apresentar crescimento pleno quando somente uma das fontes de carbono está presente no meio. Ainda, quando o meio possui apenas a fonte de carbono que é a via secundária de utilização, o microrganismo não se multiplica tanto quando poderia. Isso explica por que a cepa apresentou maior concentração de células no meio YEPDX, que possui as duas fontes de carbono utilizada pela G2-104, seguido pelo meio YEPD, já que a glicose é sua via principal de utilização e, por último, YEPX, que é sua via secundária.

Para que fosse estabelecida a curva de crescimento da G2-104 no meio em que se deseja trabalhar, a cepa foi crescida no meio de hidrolisado de coco por 54 horas em leitor de microplacas e os dados analisados utilizando-se do programa Gen5 (figura 13).

Em 54 horas de crescimento em meio de hidrolisado de coco (figura 12), a levedura apresentou duas fases de crescimento, O primeiro após as 10 horas de experimento, e o segundo após 36 horas de crescimento. Em sua primeira fase de crescimento, a levedura não apresenta um crescimento exponencial, que só ocorre de fato após as 36 horas. Após 40 horas de experimento a população chega em sua fase estacionária, não apresentando fase de declínio nas 56 horas de experimento. Como dito anteriormente, o meio de coco possui diversos inibidores do crescimento e da fermentação, o que causa o crescimento anômalo da população.

Apesar de apresentar resistência aos inibidores, a fase Lag da cepa em meio

de casca de coco verde (Figura 13) é mais longa que em meio YEPD e YEPDX, provavelmente pela grande quantidade de inibidores e grande quantidade de açúcares.

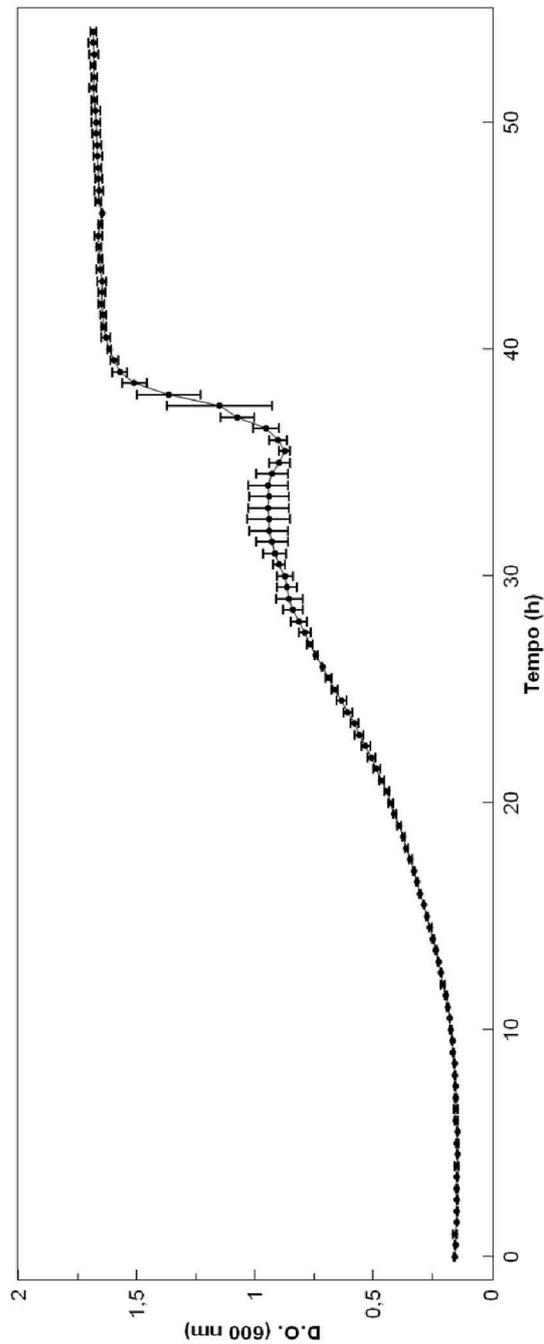


Figura 13: Curva de crescimento da levedura *S. cerevisiae* em meio de cultura de biomassa. Cepa G2-104 em meio de cultura hidrolisado de coco verde por 54 horas. O eixo Y representa a densidade óptica (concentração) lida em 600 nm e o eixo X representa o tempo em horas.

4.3 A SOBREVIVÊNCIA DA G2-104 SOB ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Para avaliar a viabilidade da cepa G2-104 sob alta pressão hidrostática, ferramenta de seleção direcionada que se pretende utilizar no trabalho, sua sobrevivência foi avaliada a 50, 100, 150 e 200 MPa por 30 minutos (Figura 14).

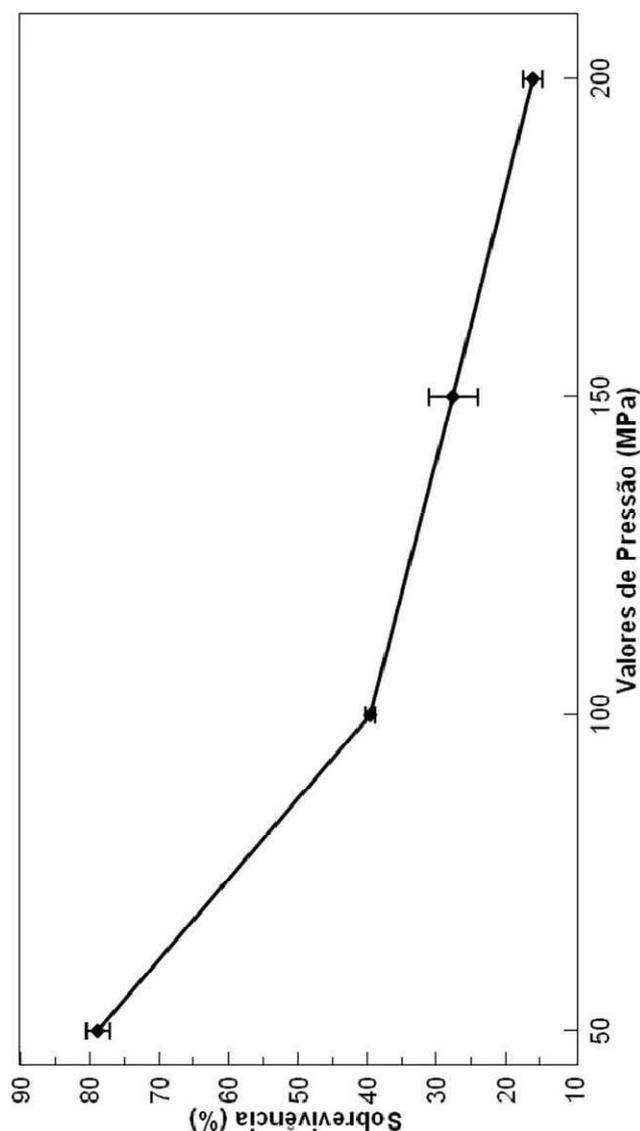


Figura 14: A sobrevivência da levedura *S. cerevisiae* sob alta pressão hidrostática. A figura demonstra a curva de sobrevivência da cepa G2-104 sob HHP de 50, 100, 150 e 200 MPa por 30 minutos. O eixo Y representa o número de células em UFC/mL e o eixo X representa os diferentes tratamentos de pressão: 50, 100, 150 e 200.

Na figura 14, o eixo X em 0 é o controle, a quantidade de células que possuía o inóculo submetido aos tratamentos de pressão. A cepa demonstrou taxa de sobrevivência de 77,5% a 50 MPa, 40% a 100 MPa, 30% a 150 MPa e 23% a 200 MPa. Isso demonstra que a cepa é capaz de sobreviver sob HHP, e, em pressões mais altas, como de 100 e 150, possui uma sobrevivência ainda maior que outras cepas de levedura, como descrito por BRAVIM (2011).

A fim de validar o resultado, um experimento com dois valores de pressão (50 e 100 MPa) (Figura 15) foi realizado com a G2-104, a S288C, que possui resultado desses valores de pressão na literatura, a Ethanol Red e a PEDRA, que são cepas produtoras de etanol de 1ª geração. As CPE1G foram utilizadas no experimento para se avaliar se as cepas industriais em geral possuem maior sobrevivência, por serem mais adaptadas aos estresses da fermentação, ou se isso seria apenas uma característica da G2-104.

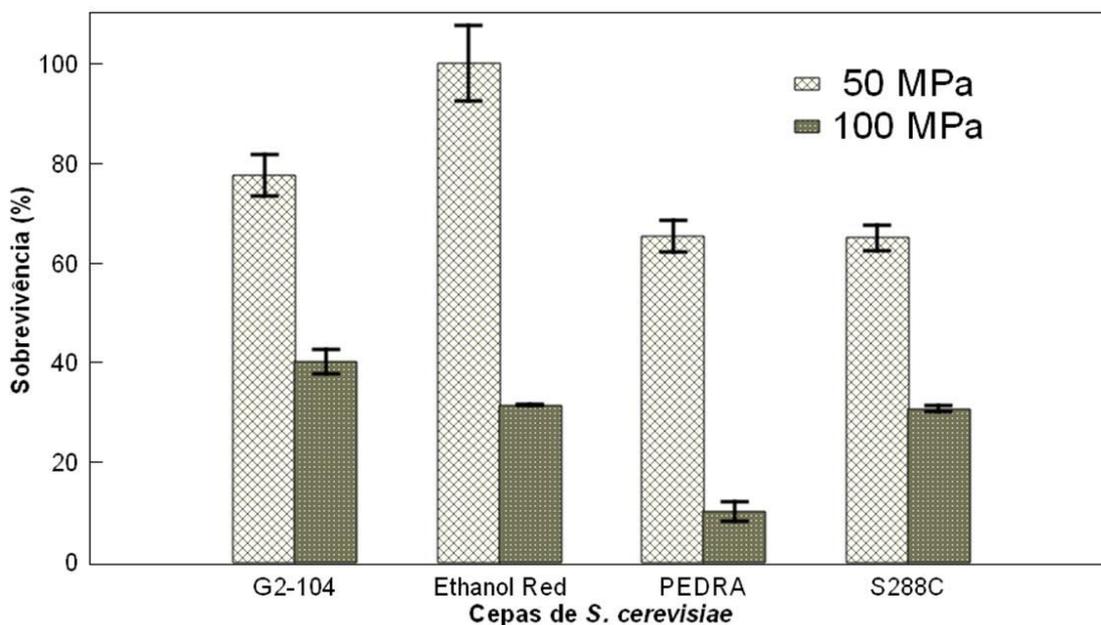


Figura 15: Sobrevivência de cepas industriais e laboratoriais de *S. cerevisiae* sob alta pressão hidrostática. As cepas utilizadas no experimento foram: Ethanol Red, G2-104, PEDRA e S288C submetidas a 50 e 100 MPa por 30 minutos. O eixo Y representa a porcentagem de sobrevivência das células e o eixo X representa as diferentes cepas utilizadas e os diferentes tratamentos de pressão: 50 e 100 MPa.

As cepas foram juntamente colocadas sob as pressões para que não houvesse erros. O resultado obtido pelo experimento é o mesmo obtido por BRAVIM (2011) em relação à cepa S288C. Apesar da cepa ER ter demonstrado 100% de sobrevivência a 50 MPa, a 100 MPa a G2-104 foi a que obteve maior valor. Além disso, as cepas industriais não apresentaram a mesma sobrevivência, demonstrando que a alta sobrevivência da G2-104 em pressões maiores é uma característica da cepa.

Esse resultado confirma a possibilidade de se realizar seleção direcionada com a G2-104 em meio de casca de coco verde, para se obter uma cepa mais resistente, uma vez que, de acordo com FERNANDES (2005), a HHP induz maior taxa de fermentação em levedura.

4.4 SELEÇÃO DIRECIONADA DE CEPA GM DE *S. cerevisiae*

Para avaliar o consumo de açúcar e a sobrevivência da cepa G2-104 por 8 dias sob HHP, foi realizado um experimento em que, a cada 48 horas uma alíquota era retirada do meio (Figura 16). Esse primeiro experimento de seleção direcionada foi realizado para que se analisasse as condições da cepa durante o tempo. Primeiro, é importante manter a cepa sob HHP sem que haja necessidade de renovação de meio, para que o experimento seja interrompido o mínimo possível, mesmo que rapidamente, o que também diminui a chance de contaminação. Além disso, era essencial saber se a cepa realmente sobreviveria tanto tempo sob HHP.

A porcentagem de sobrevivência da levedura nas primeiras 48 horas foi de 23,6%, depois de 96 horas 2,9% de sobrevivência, em 144 horas a sobrevivência caiu para 0,14% e após 182 horas a porcentagem foi de 0,03%.

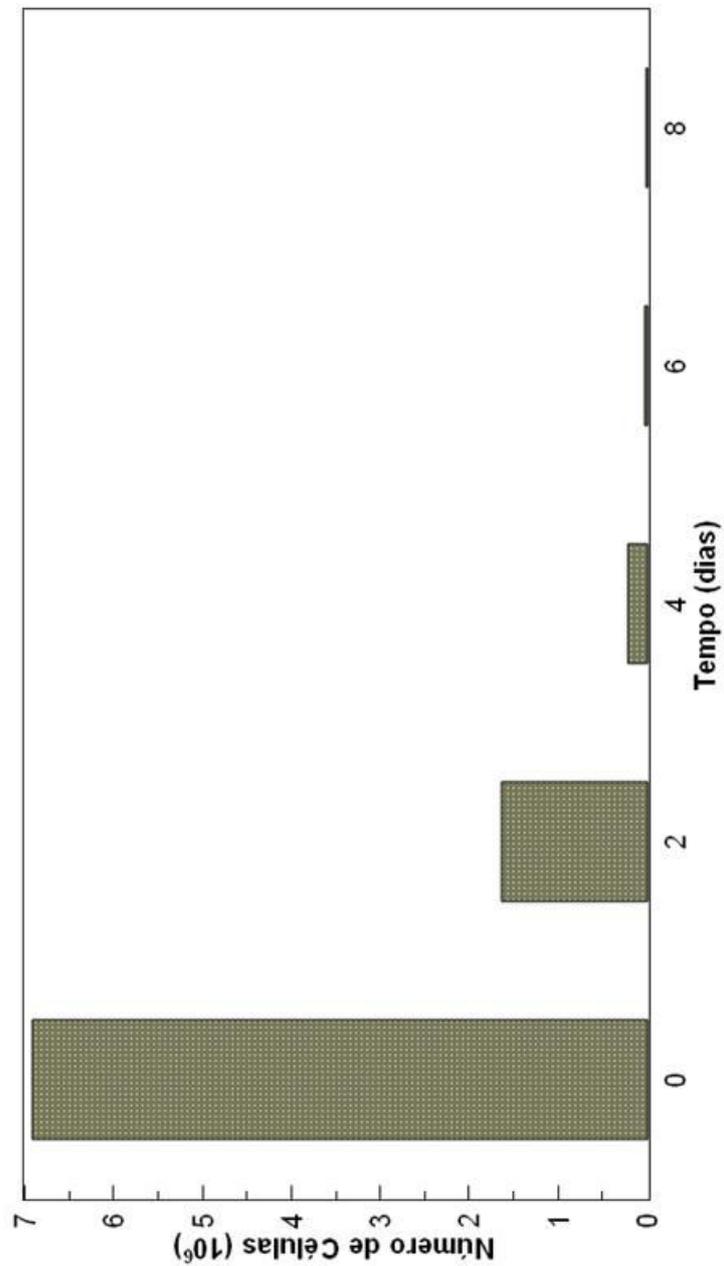


Figura 16: Avaliação da sobrevivência da cepa GM G2-104 sob seleção direcionada. Percentagem de sobrevivência da G2-104 sob 50 MPa por 8 dias em meio de hidrolisado de coco verde. O eixo Y representa o número de células e o eixo X o tempo, em dias. O eixo X em 0 representa o número inicial de células, antes de serem submetidas ao piezotratamento.

Com o resultado do experimento demonstrando baixa taxa de sobrevivência, surgiram três novas hipóteses. A primeira é que o meio ficou parado e não havia agitação alguma para que mais células pudessem entrar em contato com o meio de cultura. Além disso, o protocolo utilizado para produzir o meio de cultura ainda não usava composto algum para a redução dos inibidores do meio de coco, além de não utilizar uma solução tampão para manter o pH do meio estável. Por fim, a falta de fonte de nitrogênio no meio poderia, também, causar sua baixa taxa de sobrevivência e, para isso, uma solução de ureia (2 g/L) passou a ser adicionada ao meio. A fim de reduzir a mortalidade, provavelmente causada por essas problemáticas, foi desenvolvido um equipamento para rotação da cápsula de pressão, o rotor da capsula de HHP (Figura 17). Ainda, o protocolo de produção do meio de coco foi modificado por BOLIVAR-TELLERIA (2019) e o polietilenoglicol passou a ser utilizado para reduzir os inibidores do meio.



Figura 17: O rotor da cápsula de HHP. Na figura, o novo equipamento desenvolvido por Alvaro Luiz Santos, Alvaro Favarato Santos e Luiza Favarato Santos com o objetivo de girar a cápsula de Cu-Be contendo as células de levedura, para que estas não se depositem no fundo.

4.5 AVALIAÇÃO DA MUDANÇA DE COMPORTAMENTO DA CEPAS SOB SELEÇÃO DIRECIONADA COM MUDANÇA DE PROTOCOLO

Com o objetivo de testar as hipóteses que surgiram no experimento anterior, o experimento foi realizado novamente com as mudanças feitas. A porcentagem de sobrevivência da cepa passou a ser de $68,6 \pm 3,0\%$, contra $0,03\%$ no experimento anterior. Pode-se observar a formação de bolhas (figura 18), que representa a produção de CO_2 e, conseqüentemente, a fermentação da levedura. Além disso, observa-se o alto consumo do meio de cultura, uma vez que na hora 0 do experimento, o eppendorf se encontrava completamente cheio e sem bolha alguma. Quando comparado com o controle (figura 19), o tratado apresentou maior formação de bolhas e maior consumo do meio de cultura, demonstrando maior fermentação sob HHP.

Com o aumento da sobrevivência da levedura, é possível mantê-la sob HHP por mais tempo, sendo possível realizar a seleção direcionada da G2-104. Além disso, em todos os tratamentos com a HHP por 8 dias pode-se observar uma mudança de pelo menos uma UFC a cada plaqueamento do experimento (Figura 20).



Figura 18: A fermentação da cepa GM de *S. cerevisiae* sob seleção direcionada. Tubos de eppendorf com meio de cultura contendo levedura após tratamento com HHP de 50 MPa por 8 dias em meio de hidrolisado de coco verde. Pode-se observar a formação de bolhas e o alto consumo do meio de cultura.



Figura 19: A formação de bolhas causada pela fermentação da levedura *S. cerevisiae*. a) Tubo com meio de cultura de hidrolisado de coco verde contendo leveduras após 8 dias sob HHP de 50 MPa; b) Tubo com meio de cultura de hidrolisado de coco verde contendo leveduras após 8 dias a pressão ambiente.

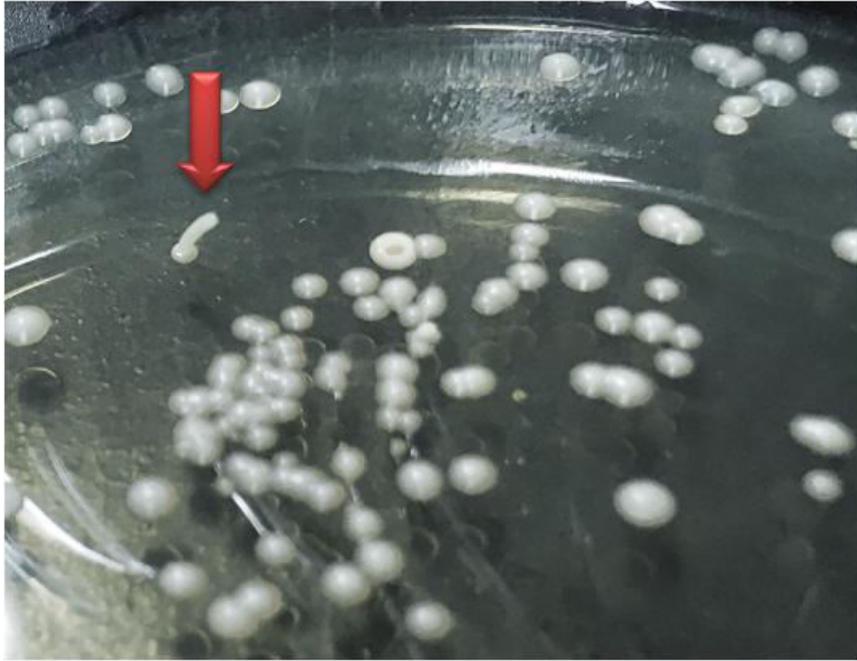


Figura 20: A mudança na conformação da unidade formadora de colônia da cepa G2-104 após seleção direcionada. Como apontado pela seta, houve uma mudança na conformação de pelo menos uma UFC a cada plaqueamento feito após o piezotratamento.

4.6 A CAPACIDADE FERMENTATIVA DA G2-104 APÓS A SELEÇÃO DIRECIONADA

Após o tratamento de seleção direcionada sob a alta pressão hidrostática (50 MPa) por 8 dias com as mudanças no protocolo, avaliou-se a capacidade fermentativa da cepa GM, comparativamente com o controle, que também esteve por 8 dias em condição anaeróbica, porém, à pressão ambiente (0.1 MPa). Com isso, pode-se demonstrar a mudança de comportamento da G2-104 após o piezotratamento. FERNANDES (2005) já havia comprovado o aumento da capacidade fermentativa da *S. cerevisiae* sob a alta pressão hidrostática. Porém, em seus experimentos, esse comportamento não se repetia em 0.1 MPa, uma vez que uma avaliação da cepa durante 8 dias não havia sido testada.

Dessa forma, utilizando-se do método de pesagem (Tabela 1) e da medida do °Brix, foi realizado o experimento para avaliar a fermentação da cepa após o piezotratamento.

Tabela 2: Avaliação da fermentação pelo método de pesagem

PESO			
Amostra	Inicial (g)	Final (g)	Perda (%)
Controle	12,37	12,22	1,25
Tratado	12,33	10,81	12,44

O resultado demonstra que a linhagem mantida sob piezotratamento apresenta maior perda de peso que a linhagem mantida à pressão ambiente (0.1 MPa), havendo maior consumo do meio de cultura, o que demonstra maior produção de etanol.

Com isso, comprova-se que a alta pressão hidrostática como ferramenta de seleção direcionada, por aproximadamente 130 gerações (8 dias), metade da quantidade necessária para ocorrer uma mutação definitiva, aumenta a capacidade fermentativa de *S. cerevisiae*, apesar de não se saber por quanto tempo a característica permenececerá.

Apesar da diferença no consumo de meio, a técnica de medida de açúcares por °Brix refratométrico apresentou apenas 36% de consumo dos açúcares, tanto no controle, quanto no tratado.

5. CONCLUSÃO

A utilização da casca de coco verde como biomassa é uma solução sustentável para a produção do etanol de segunda geração. O meio, porém, possui diversos inibidores e todas as variáveis devem ser levadas em consideração para que haja um aumento no rendimento do processo, como o protocolo utilizado, a agitação do meio e o estudo aprofundado do microrganismo utilizado para que se tenha certeza que o meio possui todos os nutrientes necessários para que a levedura consiga produzir todos os metabólitos necessários à sua sobrevivência e crescimento.

A utilização de uma cepa GM que degrade a xilose também é essencial no processo, uma vez que este açúcar existe em grande quantidade no meio da casca de coco verde e sua utilização aumenta o rendimento do processo de produção do etanol de segunda geração. Também, a robustez da cepa em relação à tolerância aos inibidores é importante para que a cepa possua maior capacidade fermentativa nesse meio.

Após a análise dos dados obtidos, pode-se inferir que a G2-104 possui as características necessárias para sobreviver à seleção direcionada utilizando a alta pressão hidrostática como ferramenta, por sua resistência às altas pressões, como nos valores de 100 e 150 MPa. Além disso, a criação de um agitador (rotor da cápsula de HHP) levou, junto com a utilização do protocolo desenvolvido por BOLIVAR-TELLERIA (2019), a um aumento da sobrevivência da cepa sob HHP por 8 dias.

Por fim, pôde-se constatar um aumento de 90% da capacidade fermentativa da cepa GM G2-104 de *S. cerevisiae* após o piezotratamento por 130 gerações.

6. PERSPECTIVAS

De acordo com a literatura, são necessárias 240 gerações para que uma característica seja definitiva na levedura, para que ocorra uma mutação. Por isso, utilizando-se da contribuição do presente trabalho, é necessário que se realize a seleção direcionada da levedura por 15 dias sob HHP de 50 MPa, realizando um *screening* da população obtida a fim de selecionar aquelas com maior capacidade fermentativa.

Além disso, é importante que se realize um sequenciamento do gene da nova cepa obtida e uma análise da expressão gênica, com o objetivo de localizar as mutações ocorridas e as diferenças na metilação das regiões do gene, comparativamente com as da G2-104 sem a seleção direcionada. Assim, pode-se conhecer os genes responsáveis por essa mudança de comportamento na levedura, podendo, até mesmo, desenvolver um organismo cisgênico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe F. Hydrostatic pressure promotes the acidification of vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters** [Internet]. Aug 1, 1995;130(2-3):307-312. Available from: <[http://doi.wiley.com/10.1016/0378-1097\(95\)00223-R](http://doi.wiley.com/10.1016/0378-1097(95)00223-R)>.

Abe F, Horikoshi K. Tryptophan permease gene TAT2 confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**. 2000;20(21):8093-8102.

BENASSI, A. C.; FANTON, C. J.; SANTANA, E. N. DE. O cultivo do coqueiroanão-verde: tecnologias de produção. **Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural**, 2013.

BOLIVAR-TELLERIA, M., TURBAY, C., FAVARATO, L., CARNEIRO, T., de BIASI, R. S., FERNANDES, A. A. R., SANTOS, A. M. C. e FERNANDES P. M. B. Second-Generation Bioethanol from Coconut Husk. **Biomed Research International**. Hindawi, Volume 2018, ID do Artigo 4916497 – 20 páginas. DOI: <<https://doi.org/10.1155/2018/4916497>>. 2018.

FELDMANN, H. et al. **Yeast**. Bergkirchen: Wiley-Blackwe. Alemanha. 2012.

BRAVIM, F. **Isolamento e indução de resistência em leveduras para produção de cachaça**. 2007. Universidade Federal do Espírito Santo, [s. l.], 2007.

BRISTOTI, Anildo; SILVA, Jairo L. dos S. **Diagnóstico da utilização e da oferta da biomassa vegetal no Rio Grande do Sul**, Núcleo de Energia, PROMEC, UFRGS, Porto Alegre. 1993.

CHOUDHARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. **Electronic Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 21, p. 82–92, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345816300161>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

CTBE - LABORATÓRIO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO BIOETANOL. **Coquetel enzimático do CTBE para a produção do etanol 2G**. 2014. Disponível em: <<http://ctbe.cnpem.br/coquetel-enzimatico-ctbe-etanol-2g/>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

EMBRAPA. **Tecnologia aproveita casca de coco verde e ajuda a despoluir praias e cidades**. Brasília.

FAPESP. **Etanol de segunda geração poderá ser economicamente viável a partir de 2025**. São Paulo. Disponível em:

<http://agencia.fapesp.br/etanol_de_segunda_geracao_podera_ser_economicamente_viavel_a_partir_de_2025/26272/>.

FAPESP. **Aprimorar coquetéis enzimáticos é caminho para etanol celulósico.** 2012. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/aprimorar_coqueteis_enzimaticos_e_caminho_para_etanol_celulosico/15588/>. Acesso em: 12 nov. 2017.

Fernandes PM, Panek AD, Kurtenbach E. Effect of hydrostatic pressure on a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deleted in the trehalose-6-phosphate synthase gene. **FEMS Microbiology Letters**. 1997;152(1):17-21

FERNANDES, P. M. B. How does yeast respond to pressure? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 38, n. 8, p. 1239–1245, 2005.

FONSECA, A. D. Biomass-to-liquids : uma contribuição ao estudo da obtenção de biocombustíveis sintéticos através da síntese fischer – tropsch. 2009. **Universidade de São Paulo**, [s. l.], 2009.

GALBE, M. e ZACCHI G. Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials, **Biomass & Bioenergy**, vol. 46, pp. 70–78, 2012.

GLASS, N. L., SCHMOLL, M., CATE, J. H. D., CORADETTI, S. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 477–498, 2013

GRANBIO. **Industria - Biocombustível**. [s.d.]

HAN, J. S. Properties of Nonwood Fibers. **1998 Proceedings of Korean Society of Wood Science and Technology Annual Meeting**, [s. l.], p. 3–12, 1998. Disponível em: <<http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1998/han98a.pdf>>

HAHN-HAGERDAL, B., HIMMEL, M. E., SOMERVILLE, C., e WYMAN, C. “Welcome to Biotechnology for Biofuels,” **Biotechnology for Biofuels**, vol. 1, 2008.

HARDIE DG (1999) Roles of the AMP-activated/*SNF1* protein kinase family in the response to cellular stress. **Biochem Soc Symp** 64:13-27

HARDIE DG, CARLING D, CARLSON M (1998) The AMP-activated/*SNF1* protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? **Annu Rev Biochem** 67:821-855

HOHMANN, S.; MAGER, W. H. **Yeast stress responses**. [s.l.] : Springer, 2003.

IBGE. **Agropecuária puxa o PIB de 2017**. Brasília. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/agropecuaria-puxa-o-pib-de-2017>>.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 2017a.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **PAM - Produção Agrícola Mundial 2016**. 2017b. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 10 dec. 2017.

IEA - INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Key world energy statistics**. Paris.

JOHANSSON, Thomas B. et al., 1993. Renewable energy: sources for fuels and electricity, **Island Press**, Washington, DC. 1993.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 199, p. 103–112, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415014042>>. Acesso em: 19 dec. 2017.

KLASS, D. L. **Biomass for renewable energy, fuels, and chemicals**. Academic Press. ed. 1. p. 651. San Diego. 1998.

Kobori H, Sato M, Tameike A, Hamada K, Shimada S, Osumi M. Ultrastructural effects of pressure stress to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae* : A study by immunoelectron microscopy using frozen thin sections. *FEMS Microbiology Letters*. 1995;132(N3):253-258

LIANG, Y., YUAN, Y., LIU, T., MAO, W., ZHENG, Y., LI, D. Identification and computational annotation of genes differentially expressed in pulp development of *Cocos nucifera* L. by suppression subtractive hybridization. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 205, 2014

LYND, L. R. “The grand challenge of cellulosic biofuels,” *Nature Biotechnology*, vol. 35, no. 10, pp. 912–915, 2017.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. D. Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2014.

MENEZES, E. G. T. et al. **Caracterização e pré-tratamento da polpa de café**. 2011. Disponível em: <http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio7/330.pdf>

MENEZES, E. G. T. **Produção de etanol utilizando resíduos do processamento úmido do café**. 2012. Universidade Federal de Lavras, [s. l.], 2012. Disponível em: <[http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/4580/1/DISSERTAÇÃO_Produção de etanol utilizando resíduos do processamento úmido do café.pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/4580/1/DISSERTAÇÃO_Produção_de_etanol_utilizando_resíduos_do_processamento_úmido_do_café.pdf)>. Acesso em: 10 dec. 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agropecuária puxa o PIB de 2017**. 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/agropecuaria-puxa-o-pib-de-2017>>. Acesso em: 05 dez. 2017.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **MMA quer conhecer potencial brasileiro de biomassa florestal**. Brasília.

NASA - GLOBAL CLIMATE CHANGE. **Climate change: How do we know?** 2017. Disponível em: <<https://climate.nasa.gov/evidence/>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

Palhano FL, Gomes HL, Orlando MTD, Kurtenbach E, Fernandes PMB. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. **Cellular and Molecular Biology** (Noisy-le-Grand, France) [Internet]. 2004 Jun;50(4):447-457. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15529754>

PANDEY et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical engineering journal**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 153–162, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10959086>>. Acesso em: 19 dec. 2017.

PERES, S. Gás do bagaço de cana: um combustível substituto do gás natural, **XV SNTPEE**, 1999.

PROBSTEIN, R. F.; HICKS, R. E. Synthetic Fuels. ed.1. **New York: McGraw Hill Book Company**, 1982. 490p

Rivalain N, Roquain J, Demazeau G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. **Biotechnology Advances** [Internet]. Nov 2010;28(6):659-672. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.04.001

ROCHA, M. S. R. dos S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; DA CRUZ, A. J. G. Avaliação Do Potencial Energético De Resíduos Agroindustriais Provenientes De Diferentes Regiões Brasileiras. **Engevista**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 217–235, 2017.

ROSA, M. F. et al. Valorização De Resíduos Da Agroindústria. **II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais**, [s. l.], v. I, p. 98–105, 2011.

SAHA, K., U. M. R, SIKDER, J., CHAKRABORTY, S., S. S. da SILVA S. S., e dos SANTOS, J. C. “Membranes as a tool to support biorefineries: Applications in enzymatic hydrolysis, fermentation and dehydration for bioethanol production,” **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, vol. 74, pp. 873–890, 2017.

SEIDL, P. R.; GOULART, A. K. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [s. l.], v. 2, p. 48–53, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452223616300232?via%3Dihub>>. Acesso em: 19 dec. 2017.

SIMS, R., Flammini, A., PURI, M. e BRACCO, S. “Opportunities for Agri-Food Chains to become Energy-Smart,” **FAO USAID**, 2015.

SOARES, J. **Produção de etanol a partir do coco verde utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* industriais**. Universidade Federal do Espírito Santo, [s. l.], 2016.

Somero GN. Adaptations to high hydrostatic pressure. **Annual Review of Physiology** [Internet]. Oct 1992;54(1):557-577. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ph.54.030192.003013>

SOUZA, R. F. R. **Produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático do bagaço da cana-de-açúcar por leveduras isoladas do bioma amazônico**. 2014. UFPE, [s. l.], 2014.

SPADOTTO, C. A.; RIBEIRO, W. C. **Gestão De Resíduos Na Agricultura**. [s.l.: s.n.].

SUN, Y. e CHENG, J. “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review,” **Bioresource Technology**, vol. 83, no. 1, pp. 1–11, 2002.

SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 199, p. 49–58, 2016.

TZVELEV, N. N. The system of grasses (Poaceae) and their evolution. **The Botanical Review**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 141–204, 1989.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes — factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

WANG, M., LI, Z., FANG, X., WANG, L., QU, Y. Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production.

Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v. 123, n. July 2015, p. 1–24, 2012.

WEREKO-BROBBY, CHARLES Y.; HAGEN, ESSEL B. Biomass conversion and technology. UNESCO energy engineering series, **John Wiley & Sons, Ltd.**, England, 203p. 1996.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels Bioprod. Bioref**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 26–4026, 2008. Disponível em: <[http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.725.4359&rep=rep1type=pdf](http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.725.4359&rep=rep1&type=pdf)>. Acesso em: 19 dec. 2017.