



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**TIAGO LIMA DE ALBUQUERQUE**

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL A PARTIR DE  
HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CAJU**

**FORTALEZA**

**2014**

TIAGO LIMA DE ALBUQUERQUE

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL A PARTIR DE  
HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CAJU**

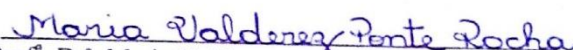
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Biotecnológicos  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha. Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. José Ivanildo da Silva Junior

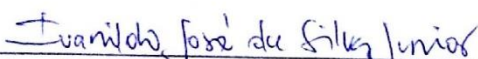
TIAGO LIMA DE ALBUQUERQUE

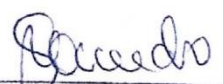
**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL A PARTIR  
DE HIDROLISADO DEBAGAÇO DE CAJU**

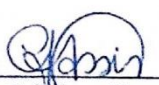
Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Mestre em  
Engenharia Química. Área de  
concentração: Processos Químicos e  
Bioquímicos.

Aprovado em 04 de fevereiro de 2014

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Valderey Ponte Rocha (Orientadora)  
Universidade Federal de Ceará – UFC

  
Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior (Co-orientador)  
Universidade Federal de Ceará – UFC

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Gorete Ribeiro de Macedo  
Examinadora externa DEQ/UFRN

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Cristiane Fernandes de Assis  
Examinadora Externa DF/UFRN

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- A314p      Albuquerque, Tiago Lima de.  
              Produção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de caju / Tiago Lima de Albuquerque. – 2014.  
              161 f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2014.  
              Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.  
              Orientação: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.  
              Coorientação: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior.
1. Biotecnologia. 2. Resíduos orgânicos. 3. Caju. 4. Reaproveitamento (Sobras, refugos, etc.). I. Título.

## AGRADECIMENTOS

Durante a caminhada na jornada da vida, diversas barreiras e obstáculos são posicionados de forma estratégica, nos proporcionando a descoberta das melhores vias de crescimento pessoal, profissional e espiritual. Diante de tantas limitações que tive que transpor até chegar aqui, me senti, por muitas vezes, impossibilitado de vencê-las, incapaz de enxergar uma saída para tantos problemas complexos que enfrentei. Contudo, a fé e a perseverança me fizeram crescer e sempre me manter com forças para seguir em frente na busca incessante pela realização dos meus sonhos. É chegado o momento de agradecer a todos aqueles, que de maneira única e direta ou indiretamente, me impulsionaram a concluir meus estudos acadêmicos.

Agradeço à Deus por ter me guiado em todas as minhas decisões e me disponibilizado as oportunidades maravilhosas que tive e estou tendo.

Aos meus pais, irmão e cunhada, que diante de tantas dificuldades, nunca desistiram de acreditar que sou capaz e de me apoiar em cada momento da minha vida.

À Professora Dra. Valderez, por todos os conselhos, profissionais ou pessoais, por toda a amizade e dedicação durante minha orientação. Além de um ser uma excelente profissional, a tenho como exemplo de vida, de luta, de perseverança e de força de vontade.

Ao professor Dr. Ivanildo por sua co-orientação e disponibilidade para me auxiliar no meu projeto.

À professora Luciana, que me recebeu de braços abertos no GPBio me ajudando em tudo aquilo que estava a seu alcance e me cedendo bons momentos de aprendizado.

À todos os companheiros do grupo de pesquisa GPBio, por todo o carinho e companheirismo durante meu mestrado. Agradeço especialmente a Sandy e Edvan (Sandy & Junior) por toda a colaboração na realização do meu trabalho e ao Ítalo, por tornar o ambiente de trabalho mais agradável com sua amizade.

À Wilker Brito, que esteve ao meu lado em cada momento dos últimos três anos, especialmente nos difíceis, me dando incentivo para seguir em frente e acreditar que sou capaz. Obrigado por tudo.

Aos meus amigos especiais, que me acompanham desde a graduação e são testemunhas de toda a luta e esforço para chegar até aqui, Rosy, Micael, Valéria e Raquel. Vocês sempre estarão no meu coração e farão parte das memórias mais divertidas e felizes que eu possa ter.

*“É preciso amar as pessoas como se não houvesse  
amanhã, porque se você para pra pensar, na  
verdade não há.” (Renato Russo)*

## SUMÁRIO

Introdução	3
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
1 Introdução	6
1.1 Xilitol	7
1.1.1 Xilitol na Indústria de Alimentos	9
1.1.2 Xilitol e suas aplicações odontológicas	11
1.1.3 Outras aplicações	13
2 Produção de xilitol	16
2.1 Produção de xilitol por via química	17
2.2 Produção biotecnológica de xilitol	19
3 Condições de cultivo microbiano visando a produção de xilitol	25
3.1 pH e temperatura	25
3.2 Aeração	27
3.3 Fontes de carbono	28
3.4 Fontes de nitrogênio	30
4 Aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de xilitol	34
4.1 Produção de biomassa lignocelulósica	34
4.2 Utilização do bagaço de caju	36
4.2.1 Caju	36
4.2.2 Conversão do bagaço de caju em açúcares fermentescíveis	37
4.2.2.1 Pré-tratamento com hidrólise ácida	41
4.2.3 Inibidores da fermentação em hidrolisados hemicelulósicos	43
4.2.4 Tratamentos para remoção dos inibidores	47
5 Purificação do xilitol	49
5.1 Cristalização e precipitação	49
5.1.1 Métodos preliminares de purificação visando a obtenção de xilitol	52
5.1.2 Cristalização	55
6 Referências	58

## **CAPÍTULO 2: POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE XILITOL POR TRÊS LEVEDURAS EM MEIOS DE CULTURA CONTENDO XILOSE E GLICOSE**

## **COMO FONTES DE CARBONO**

Resumo	77
1 Introdução	78
2 Material e métodos	81
2.1 Micro-organismos e condições de cultivo	81
2.2 Condições de cultivo	81
2.3 Condições de produção de xilitol	82
2.4 Métodos analíticos	82
3 Resultados e discussão	84
4 Conclusões	96
5 Referências	97

## **CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILITOL NO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CAJU**

Resumo	102
1 Introdução	103
2 Material e métodos	107
2.1 Micro-organismos	107
2.2 Caracterização do bagaço	107
2.2.1 Determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas	107
2.2.2 Determinação da lignina insolúvel em meio ácido	108
2.2.3 Determinação da lignina solúvel	108
2.2.4 Determinação do teor de cinzas totais	109
2.3 Hidrólise e tratamentos do bagaço de caju	110
2.4 Condições de fermentação para avaliar a produção de xilitol	110
2.4.1 Inóculo	110
2.5 Estudo do tratamento de destoxificação do hidrolisado de bagaço de caju	110



2.5.1 Meio de fermentação para avaliação da influência das fontes de nitrogênio	111
2.6 Métodos analíticos	111
2.6.1 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético, ácido fórmico, furfural, 5-hidroximentilfurfural (5-HMF), xilitol e etanol	111
2.6.2 Determinação do crescimento celular	112
2.6.3 Determinação da concentração de fenóis	112
2.6.4 Análises estatísticas	112
2.6.5 Cálculo do rendimento de xilitol ( $Y_{PI/SI}$ )	112
3 Resultados e discussão	116
3.1 Caracterização do bagaço	116
3.2 Influência da destoxificação com carvão ativado na fermentação do hidrolisado de bagaço de caju	125
3.3 Influência da suplementação do hidrolisado de bagaço de caju com diferentes fontes de nitrogênio	133
4 Conclusões	143
5 Referências	144

## LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1		
<b>Figura 1.1:</b>	Estrutura molecular do xilitol	8
<b>Figura 1.2:</b>	Exemplos de produtos com xilitol em sua composição	12
<b>Figura 1.3:</b>	Mecanismo de formação de cáries e processo de remineralização dos dentes decorrente do consumo de xilitol	13
<b>Figura 1.4:</b>	Processo de obtenção do xilitol por via química resumidamente	18
<b>Figura 1.5:</b>	Via metabólica geral de D-xililose em leveduras	22
<b>Figura 1.6:</b>	Produção de xilitol a partir de biomassa lignocelulósica	35
<b>Figura 1.7:</b>	Caju e seus componentes (Pedúnculo e castanha)	36
<b>Figura 1.8:</b>	Principais produtos que são formados durante a hidrólise de material lignocelulósico	44
<b>Figura 1.9:</b>	Diagrama de processo geral de escala de bancada para bioprodução de xilitol a partir de material lignocelulósico	50
<b>Figura 1.10:</b>	Esquema do processo considerado para purificação de xilitol a partir de meio composto por sabugo de milho hidrolisado	52
<b>Figura 1.11:</b>	Fotografia de xilitol purificado e cristalino do após tratamento com carvão ativado e seguido por concentração a vácuo e pelo método de cristalização	55
CAPÍTULO 2		
<b>Figura 2.1:</b>	Reação simplificada da metabolização de xilose e glicose por leveduras	79
<b>Figura 2.2:</b>	Fermentação no meio MX para avaliar a produção de xilitol a 30 °C e 200 rpm por <i>C. tropicalis</i> (A), <i>K. marxianus</i> CCA 510 (B) e <i>K. marxinaus</i> 36907 (C): (▲) biomassa, (□) xilose e (●) xilitol.	86
<b>Figura 2.3:</b>	Fermentação no meio MXG para avaliar a produção de xilitol a 30 °C e 200 rpm por <i>C. tropicalis</i> (A), <i>K. marxianus</i> CCA 510 (B) e <i>K. marxinaus</i> 36907 (C): (▲) biomassa, (□) xilose, (▽) glicose, (●) xilitol e (◆) etanol	88
<b>Figura 2.4:</b>	Taxa de crescimento específico ( $\mu_X$ , —), consumo de xilose ( $\mu_{S1}$ , —) e produção de xilitol ( $\mu_{P1}$ , ...) durante fermentação no meio MX por <i>C. tropicalis</i> (A), <i>K. marxianus</i> CCA510 (B) e <i>K. marxianus</i> ATCC36907 (C) a 30 °C e 200 rpm.	94

- Figura 2.5:** Taxa de crescimento específico ( $\mu_X$ , —), consumo de xilose ( $\mu_{S1}$ , — —), consumo de glicose ( $\mu_{S2}$ , - · -) e produção de xilitol ( $\mu_{P1}$ , ...) durante fermentação no meio MXG por *C. tropicalis* (A), *K. marxianus* CCA510 (B) e *K. marxianus* ATCC36907 (C) a 30 °C e 200 rpm. 95

### CAPÍTULO 3

- Figura 3.1:** Visão geral da assimilação de nitrogênio por leveduras (Walker, 1998). 105
- Figura 3.2:** Fluxograma dos experimentos realizados visando avaliar a influência da destoxificação do HBC na produção de xilitol. 114
- Figura 3.3:** Fluxograma dos experimentos realizados visando avaliar a influência das fontes de nitrogênio na produção de xilitol. 115
- Figura 3.4:** Remoção dos açúcares e compostos tóxicos presentes no HBC em diferentes tratamentos de destoxificação: HBC-2 (■), HBC-3 (■) e HBC-4 (■). 121
- Figura 3.5:** Aspectos dos hidrolisados: (A) Hidrolisado de bagaço de caju sem ajuste de pH, (B) Hidrolisado de bagaço de caju com pH ajustado com  $\text{Ca(OH)}_2$ , (C) Hidrolisado bagaço de caju concentrado, (D) Hidrolisado bagaço de caju concentrado e tratado com carvão ativado em grânulos e (E) Hidrolisado bagaço de caju concentrado e tratado com carvão em pó. 123
- Figura 3.6:** Fermentação, por *Candida tropicalis*, de meios formados HBC com diferentes tratamentos: (A) meio não concentrado, (B) meio concentrado e sem tratamento, (C) meio concentrado com carvão (grânulos) e (D) meio concentrado com carvão (pó). Biomassa (▲), etanol (◆), xilitol (●), glicose (▽) e xilose (□):200 rpm a 30 °C por 120h. 125
- Figura 3.7:** Fermentação, por *Kluyveromyces marxianus* CCA 510, de meios formados por HBC com diferentes tratamentos: (A) meio não concentrado, (B) meio concentrado e sem tratamento, (C) meio concentrado com carvão (grânulos) e (D) meio concentrado com carvão (pó). Biomassa (▲), etanol (◆), xilitol (●), glicose (▽) e xilose (□):200 rpm a 30 °C por 120h 127
- Figura 3.8:** Produção de xilitol obtida a partir de diversos resíduos hemicelulósicos, incluindo bagaço de caju do presente estudo. 131
- Figura 3.9:** Fermentação por *Kluyveromyces marxianus* CCA510 de meios formados por HBC com diferentes fontes de nitrogênio (3 g.L<sup>-1</sup>) a 30 °C e 200 rpm: (A) sem fonte de nitrogênio, (B) ureia, (C) sulfato de amônio e (D) extrato de levedura. Biomassa (▲), etanol 136

(♦), xilitol (●), glicose (□) e xilose (□).

**Figura 3.10** Fermentação por *Candida tropicalis* de meios formados por hidrolisado de bagaço de caju com diferentes fontes de nitrogênio (3 g.L<sup>-1</sup>) a 30 °C e 200 rpm: (A) sem fonte de nitrogênio, (B) ureia, (C) sulfato de amônio e (D) extrato de levedura. Biomassa (▲), etanol (♦), xilitol (●), glicose (□) e xilose (□). 138

## LISTA DE TABELAS

Capítulo 1		
<b>Tabela 1.1:</b>	Exemplos de materiais lignocelulósicos utilizados para produção de xilitol	17
<b>Tabela 1.2:</b>	Leveduras utilizadas na produção de xilitol	20
<b>Tabela 1.3:</b>	Atividades específicas de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) em leveduras	23
<b>Tabela 1.4:</b>	Produção de xilitol por diferentes cepas de leveduras a partir de resíduos lignocelulósicos	32
<b>Tabela 1.5:</b>	Classificação dos pré-tratamentos segundo efeito sobre a matéria-prima	39
<b>Tabela 1.6:</b>	Concentrações dos principais inibidores que interferem na fermentação microbiana presentes em hidrolisados lignocelulósicos	45
<b>Tabela 1.7:</b>	Condições experimentais usadas em cada coluna para fracionamento de fermentado de hidrolisado de bagaço de cana	53
<b>Tabela 1.8:</b>	Métodos de cristalização utilizados para recuperação de xilitol, rendimento da cristalização e do xilitol recuperado	56
Capítulo 2		
<b>Tabela 2.1:</b>	Rendimento em biomassa, $Y_{X/S1}$ (g.g <sup>-1</sup> ) e $Y_{X/S}$ (g.g <sup>-1</sup> ), rendimento em xilitol, $Y_{P1/S}$ (g.g <sup>-1</sup> ), produtividade volumétrica de xilitol, $Q_{P1}$ (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ), e produtividade máxima de xilitol, $P_I^{max}$ , por <i>C. tropicalis</i> , <i>K. marxianus</i> CCA510 e <i>K. marxianus</i> ATCC36907 em meio MX e MXG.	92
Capítulo 3		

<b>Tabela 3.1:</b>	Legendas dos tratamentos realizados no HBC para avaliar produção de xilitol	111
<b>Tabela 3.2:</b>	Composição química percentual (em massa) do bagaço de caju “in natura” e após hidrólise ácida (20% m/v, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,6 mol.L <sup>-1</sup> , 121 °C por 30 min).	116
<b>Tabela 3.3:</b>	Composição de hidrolisados hemicelulósicos expressados em concentração de açúcares.	118
<b>Tabela 3.4:</b>	Composição dos meios formulados a partir de hidrolisado do bagaço de caju	120
<b>Tabela 3.5:</b>	Rendimentos de xilitol por <i>K. marxianus</i> CCA510 e <i>Candida tropicalis</i> no hidrolisado (HBC) submetido a diferentes tratamentos	130
<b>Tabela 3.6:</b>	Rendimentos de xilitol por <i>K. marxianus</i> CCA510 e <i>Candida tropicalis</i> no hidrolisado (HBC) com diferentes fontes de nitrogênio.	140
<b>Tabela 3.7:</b>	Fontes de nitrogênio utilizadas em fermentações visando à produção d xilitol por leveduras	142

## LISTA DE QUADROS

<b>Capítulo 1</b>		
<b>Quadro 1.1:</b>	Características e propriedades físico-químicas do xilitol	9
<b>Quadro 1.2:</b>	Propriedades benéficas do xilitol	9

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### Capítulo 1

<b>5-HMF</b>	5-hidroximetilfurfural
<b>ANVISA:</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BC:</b>	Bagaço de caju
<b>CLAE:</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>FDA:</b>	Food and Drug Administration
<b>GRAS:</b>	Do inglês <i>Generally Recognized As Safe</i>
<b>HBC:</b>	Hidrolisado de bagaço de caju
<b>HBC-1:</b>	Hidrolisado Não foi concentrado após ajuste do pH
<b>HBC-2:</b>	Hidrolisado concentrado sem tratamento
<b>HBC-3:</b>	Hidrolisado concentrado tratado com carvão ativado em grânulos
<b>HBC-4:</b>	Hidrolisado concentrado tratado com carvão ativado em pó
<b>MSR:</b>	Metodologia de Superfície de Resposta
<b>MX:</b>	Meio contendo xilose como fonte de carbono
<b>MXG:</b>	Meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono
<b>RCC:</b>	Repressão catabólica de carbono
<b>XDH:</b>	Xilitol desidrogenase
<b>XI:</b>	Xilose isomerase
<b>XK:</b>	Xiluloquinase
<b>XR:</b>	Xilose redutase
<b>YEPD:</b>	Do inglês <i>Yeast-Extract-Peptide-Dextrose</i>

## RESUMO

A utilização de resíduos agroindustriais como matéria-prima para obtenção de produtos com maior valor agregado tem recebido grande destaque no campo científico nos últimos anos. Esses materiais são descartados no ambiente, conduzindo a prejuízos ambientais de grandes proporções ou, quando utilizados, não são empregados de forma plena e sustentável. O Brasil se destaca na produção agrícola mundial de diversos produtos, sendo a região nordeste a maior produtora nacional de caju, incluindo assim o país em uma situação de destaque global em relação a esse cultivo. No processamento, retira-se a amêndoa do caju, que em geral é exportada com excelente preço de mercado, e extrai-se o suco, restando uma considerável quantidade de bagaço. Esse componente, por sua vez, possui preço comercial irrisório podendo ser utilizado na adubação e em complemento a alimentação animal. O bagaço do caju (BC) é rico em celulose (17,73%) e hemicelulose (19,22%), o que o torna um material lignocelulósico apto para obtenção de diversos açúcares fermentescíveis, especialmente a glicose e a xilose. Esses carboidratos podem ser assimilados por micro-organismos originando, por meio da via biotecnológica, diversos bioprodutos, como por exemplo o xilitol. Essa substância é um poliol com importância alimentícia, farmacêutica e odontológica obtida a partir da D-xilose. Sua produção industrial ocorre a partir da hidrogenação, catalisada pela presença de ligas metálicas, da D-xilose, sob condições de elevadas temperaturas e pressões, o que eleva o custo do processo. Diversos micro-organismos, principalmente leveduras, são reportados por sua capacidade em produzir xilitol a partir de resíduos lignocelulósicos. Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi realizar um estudo pioneiro a respeito da empregabilidade do BC como substrato para a produção de xilitol por fermentação microbiana. A primeira etapa da pesquisa avaliou a produção de xilitol em meios sintéticos, compostos por xilose (MX) ou xilose e glicose (MXG), por três leveduras: *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces marxianus* CCA510 e *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907. As três leveduras foram capazes de produzir xilitol nos meios sintéticos e *C. tropicalis* e *K. marxianus* CCA510 foram selecionadas pelo seu melhor desempenho para os experimentos seguintes. A segunda etapa do trabalho consistiu em avaliar a produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC). O hidrolisado foi obtido submetendo-se o BC, após prévia lavagem, secagem e padronização de tamanho, a hidrólise ácida com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ , alcançando concentração de glicose e xilose de  $12,09 \text{ g.L}^{-1}$  e  $19,02 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. O HBC foi concentrado por evaporação e tratado com dois tipos de carvão ativado (em grânulos e em pó), observando-se que o carvão em pó foi mais eficiente para eliminação de inibidores do processo microbiana (como ácido acético, fórmico e compostos fenólicos). Por último, avaliou-se a influência da suplementação do HBC com diferentes fontes de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio e extrato de levedura) para a produção de xilitol. Concluiu-se que a ureia foi capaz de melhorar o crescimento em biomassa dos micro-organismos testados, contudo, nenhuma das fontes de nitrogênio foi significativas para o incremento da produção de xilitol. Diante do estudo, pode-se concluir que o HBC pode ser matéria-prima potencial para a produção biotecnológica de xilitol pelas leveduras empregadas e que tratamentos de destoxificação e suplementação nutricional podem ser levados em consideração para melhoria do processo.

**Palavras-chave:** Xilitol. Leveduras. Bagaço de caju. *Candida*. *Kluyveromyces*.



## ABSTRACT

The use of agro-industrial waste as raw material for the production of products with higher added value has received great attention in the scientific field in recent years. These materials are discarded into the environment, leading to large-scale environmental damage or, when used, are not employed fully and sustainably. Brazil stands out in global agricultural production of various products, being the northeast region's the largest domestic producer of cashew apple, so including the country in a situation of global spotlight in relation to this crop. Processing, retires almond cashew apple, which is usually exported with excellent market price, and extract the juice, leaving a considerable amount of bagasse. This component, in turn, has commercial price, being used as fertilizer and as animal feed supplement. Cashew apple bagasse (CAB) is rich in cellulose (17.73 %) and hemicellulose (19.22%), which makes it a suitable lignocellulosic material to obtaining various fermentable sugars, especially glucose and xylose. These carbohydrates can be assimilated by microorganisms producing, through microbial fermentation, several byproducts such as xylitol. This substance is a polyol with food, pharmaceutical and dental importance. Industrial production occurs by hydrogenation catalyzed by the presence of metal alloys, D-xylose, under conditions of high temperatures and pressures, which increases the cost of process. Several microorganisms, especially yeast, are reported by their ability to produce xylitol from lignocellulosic wastes. Thus, the aim of this work was to evaluated the employability of CAB as substrate for xylitol production by microbial fermentation. In the first stage of the research, xylitol production in synthetic media composed of xylose (MX) or xylose and glucose (MXG), by three yeasts was evaluated: *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces marxianus* CCA510 and *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907. The three yeasts were able to produce xylitol in synthetic media and *C. tropicalis* and *K. marxianus* CCA510 have been selected for their best performance for the following experiments. The second stage of the work was to evaluate the production of xylitol from hemicellulosic cashew apple bagasse hydrolysate (CABH). The hydrolysate was obtained by subjecting the CAB, after prior washing, drying and standardization of size, to acid hydrolysis with  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0.6 \text{ mol L}^{-1}$ , leading to concentrations of glucose and xylose of  $12.09 \text{ g.L}^{-1}$  and  $19.02 \text{ g L}^{-1}$ , respectively. The CABH was concentrated by evaporation and treated with two types of activated carbon (granular or powder), noting that charcoal powder was more effective in eliminating microbial fermentation inhibitors (such as acetic acid, formic acid and phenolic compounds). Finally, it was evaluated the influence of supplementation of CABH with different nitrogen sources (urea, ammonium sulfate and yeast extract) for the production of xylitol. It was concluded that urea was able to improve growth in biomass of the microorganisms tested, however, none of the sources of nitrogen were significant for increasing the production of xylitol. It was concluded that the CABH is a potential feedstock for the biotechnological production of xylitol by yeast and detoxification treatment and nutritional supplementation may be considered to improve the process.

**Keywords:** Xylitol. Yeast. Cashew Apple Bagasse. *Candida*. *Kluyveromyces*.

## INTRODUÇÃO

Diversos estudos tem buscado avaliar modos alternativos de produção de xilitol, um poliol com elevada empregabilidade na indústria alimentícia e farmacêutica. A produção em larga escala dessa substância tem ocorrido há muitas décadas por um método químico de hidrogenação da D-xilose na presença de catalisadores compostos por ligas metálicas. Contudo, devido às condições utilizadas, que envolvem elevadas temperaturas e pressões, é um processo ainda muito caro. Como uma alternativa ao processo de produção tradicional, a produção biotecnológica tem sido alvo de diversas pesquisas, principalmente na última década, pois possui elevada versatilidade quanto aos micro-organismos empregados, que podem incluir bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Além disso, a produção biotecnológica pode ser realizada com a utilização de matérias-primas não convencionais, como resíduos agroindustriais de baixo custo. A utilização desses substratos alternativos como fonte de carbono para a produção se mostra promissora, pois além de ser assimilável por muitos micro-organismos é um destino para o descarte de resíduos industriais. A produção biotecnológica desse poliol depende não só da fisiologia e metabolismo de cada micro-organismo empregado no processo como, também, de características gerais do material lignocelulósico em questão. O tratamento a que é submetido os materiais lignocelulósicos para liberação dos açúcares fermentescíveis, em especial a xilose, é de fundamental importância para estabelecer uma produção viável, uma vez que se faz necessária a obtenção de uma quantidade satisfatória de carboidratos para fermentação microbiana. Como se trata de um processo envolvendo micro-organismos, a presença de compostos inibitórios presentes no hidrolisado deve ser levado em consideração e, algumas vezes, tratamentos que busquem a destoxificação do meio devem ser aplicados. Finalmente, a utilização do xilitol na indústria alimentícia ou farmacêutica pode ser realizada contanto que esse possua um grau de pureza adequada, tornando o estudo da recuperação e purificação do xilitol a partir dos meios formulados de hidrolisados hemicelulósicos um objeto de estudo de fundamental importância.

A dissertação foi dividida na forma de capítulos, que se apresentam da seguinte forma:

Capítulo 1: Constitui-se de uma revisão bibliográfica que reúne informações a respeito de diversos tópicos, como xilitol e suas aplicações, produção biotecnológica, otimização do processo (pH e temperatura, aeração, fontes de carbono e fontes de nitrogênio) e purificação do xilitol.

Capítulo 2: Realizou-se o estudo em meio semissintéticos (contendo xilose ou glicose e xilose) da produção de xilitol por três linhagens microbianas: *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces marxianus* CCA510 e *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907.

Capítulo 3: Avaliaram-se diversos aspectos quanto a produção de xilitol a partir do crescimento microbiano a partir da utilização do hidrolisado de bagaço de caju como substrato: influência da destoxificação, concentração do hidrolisado e suplementação com fontes de nitrogênio.

O objetivo geral do presente trabalho foi analisar a potencialidade do reaproveitamento do bagaço de caju (BC), matéria prima de baixo custo, para produção biotecnológica de xilitol. Dessa forma, os objetivos específicos se basearam na seleção de um micro-organismo capaz de se desenvolver satisfatoriamente no meio formulado a partir do hidrolisado hemicelulósico de BC e otimização da produção de xilitol investigando parâmetros, tais como, destoxificação com carvão ativado do meio de cultivo e adição de diferentes fontes de nitrogênio.

---

# Capítulo 1

---

## CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 INTRODUÇÃO

Nesse capítulo de revisão bibliográfica, buscou-se reunir dados sobre a produção biotecnológica de xilitol a partir de diversos resíduos agroindustriais, bem como as melhores condições de cultivo (como pH, temperatura e aeração) empregadas nesses processos.

O xilitol é um poliol ( $C_5H_{12}O_5$ ) que tem um grupo hidroxila ligado a cada átomo de carbono que o constitui e possui poder adoçante elevado, apresentando 40% menos calorias que a sacarose (PEREIRA *et al.*, 2009). É um produto intermediário que aparece durante o metabolismo de carboidratos em mamíferos, inclusive no homem (YLIKAHRI, 1979), sendo que um humano em condições normais produz de 5 a 15 gramas de xilitol por dia. Sua descoberta foi em 1891 pelo químico Emil Fischer (alemão, 1852-1919) e por sua equipe, que o prepararam na forma de xarope a partir da reação da xilose com amálgama sódica (BÄR, 1991). Como característica principal está seu alto poder refrescante que é devido ao seu elevado calor endotérmico ( $34,8 \text{ cal.g}^{-1}$ ) (MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

O xilitol é citado na literatura por suas características organolépticas e de benefícios à saúde, como: efeito refrescante natural (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2013), alta solubilidade (Carneiro *et al.*, 2012), baixo índice glicêmico (ISLAM, 2011), não carcinogênico (UITTAMO *et al.*, 2011) e cariostático (RITTER *et al.*, 2012). Além disso, o xilitol não participa das reações de *Maillard* (que podem ocasionar a formação de substâncias escuras nos alimentos) e, dessa forma, não reduz o valor nutricional das proteínas presentes (MONEDERO, PÉREZ-MARTÍNEZ e YEBRA, 2010). Suas características o tornam bastante aplicável no processamento de alimentos, como balas, caramelos, confeitos, chocolates, sorvetes, geleias, marmeladas e bebidas (MONEDERO, PÉREZ-MARTÍNEZ e YEBRA, 2010).

A produção industrial do xilitol já vem sendo realizada há quase quatro décadas e, desde o início, soluções purificadas de D-xilose passam por um processo de hidrogenação catalítica, sob condições de elevadas temperaturas ( $80\text{-}140^\circ\text{C}$ ) e pressão (até 50 atm) (CHEN *et al.*, 2010), até obtenção do poliol (processo químico). Devido às

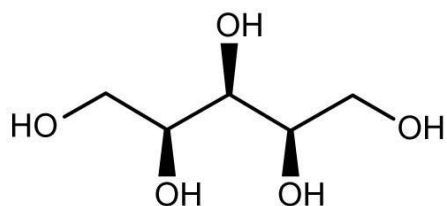
condições operacionais e a necessidade da elevada pureza da xilose empregada, esse processo tradicional se torna bastante dispendioso. Diversos estudos têm buscado vias alternativas ao processo químico, tendo os processos biotecnológicos grande destaque e por isso se tornado foco de estudos científicos. Em busca de baratear mais ainda o processo e, além disso, encontrar soluções para reaproveitamento de resíduos agroindustriais, o potencial de utilização de matérias primas renováveis vem sendo avaliado, como colmo de bambu (MIURA *et al.*, 2013), resíduos hortícolas (ZHANG *et al.*, 2012), caules de girassol (MARTÍNEZ, SÁNCHEZ e BRAVO *et al.*, 2012) e bagaço de cana-de-açúcar (ARRUDA *et al.*, 2011). Esses resíduos, por sua vez, podem ser hidrolisados, em geral por ácidos diluídos, e liberar D-xilose disponível para conversão microbiana em xilitol (WEI *et al.*, 2010).

### **1.1 Xilitol**

O aumento da ingestão de açúcares, em especial da sacarose, tem levado a ampliação dos riscos de problemas de saúde em escala mundial. Dentre os países que têm sua população enquadrada como maiores consumidores de açúcar (sacarose), encontram-se Índia (23.500t), União Europeia (19.742t), Brasil (15.000t) e Estados Unidos (12.620t) (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DE AGROENERGIA, 2012), estando, portanto, essas populações mais susceptíveis a problemas causados por esse consumo exacerbado, como obesidade e cáries (LIMA e BERLINCK, 2003).

Pesquisas têm sido realizadas para possibilitar a substituição desses açúcares, que contêm alto nível calórico, por edulcorantes, naturais ou artificiais, como o xilitol, que é um carboidrato obtido a partir da xilose, uma pentose presente em abundância na natureza, que sob hidrogenação química ou por processo biotecnológico pode ser convertida a xilitol (MÄKI-ARVELA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012). Alguns autores intitulam o xilitol (Figura 1.1) como “adoçante do futuro”, termo que é explicado devido a propriedades diferenciadas que esse álcool-carboidrato possui, tendo emprego relevante em diversos ramos industriais, como na indústria farmacêutica, alimentícia e odontológica.

**Figura 1.1:** Estrutura molecular do xilitol.



Fonte: Adaptado de Rufino *et al.* (2009).

Uma das características marcantes do xilitol, as quais estão resumidas no Quadro 1.1, é seu alto poder refrescante na boca, que é bastante explorada em produtos alimentícios, como balas e gomas de mascar. Essa característica peculiar se deve ao seu elevado calor de dissolução ( $34,8 \text{ cal.g}^{-1}$ ), que o torna, dentre os polióis, o que proporciona maior sensação de refrescância bucal (MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

O xilitol é reportado na literatura devido a suas características organolépticas (possuindo funcionalidade alimentícia) e benefícios à saúde, como mostrado no Quadro 1.2. Não apresenta efeitos teratogênicos, além de ser higroscópico, solúvel (a temperatura ambiente), tem boa estabilidade química e microbiológica, tanto em forma cristalina como em solução. A percepção da doçura é considerada semelhante à da sacarose e o poder adoçante equivalente ao da sacarose a 10%, porém a viscosidade é inferior (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2013).

**Quadro 1.1:** Características e propriedades físico-químicas do xilitol.

<b>Funções e propriedades</b>	<b>Características ou valores</b>
Massa molar	152,15 g.mol <sup>-1</sup>
Aparência	Pó cristalino
Cor	Branca
Sabor	Doce
Odor	Nenhum
Ponto de fusão	92-96 °C
Ponto de ebulição	216 °C (1 atm)
pH (solução aquosa a 10%)	5-7
Densidade (solução aquosa a 10%)	1,03 g.mL <sup>-1</sup>
Solubilidade em água a 20 °C	63 g/100 g solução
Viscosidade (solução aquosa a 10%)	1,23 cP (a 20 °C)
Calor de solução (endotérmico)	34,8 cal.g <sup>-1</sup>
Valor calórico 2,4 kcal.g <sup>-1</sup>	2,4 kcal.g <sup>-1</sup>
Índice de refração (a 25 °C)	1,3471 (solução aquosa a 10%)

**Fonte:** Adaptado de Mussatto e Roberto, 2002.

**Quadro 1.2:** Propriedades benéficas do xilitol

<b>Propriedades funcionais</b>	<b>Benefícios à saúde</b>
Efeito refrescante natural	Açúcar livre
Igual doçura a sacarose	40% menos calorias que sacarose
Alta solubilidade	Índice glicêmico baixo
Excelente estabilidade	Adequado para dietas
Baixa atividade de água	Não carcinogênico
Propriedades que mascaram sabor	Cariostático

**Fonte:** Adaptado de Bond, 2012.

### 1.1.1 Xilitol na Indústria de Alimentos

O xilitol tem um importante emprego na indústria alimentícia, devido as suas características de interesse, como alto poder adoçante (comparado ao da sacarose),



baixo teor de calorias e propriedade cariostática. Além disso, o xilitol não participa das reações de *Maillard* (a qual ocasiona a formação de substâncias escuras nos alimentos) e, dessa forma, não reduz o valor nutricional das proteínas presentes (SANTOS, 2004). Suas características o tornam bastante aplicável no processamento de alimentos: balas, caramelos, confeitos, chocolates, sorvetes, geleias, marmeladas, bebidas, etc. (SILVA *et al.*, 1994).

Na Comunidade Econômica Europeia, a segurança do uso de xilitol foi reconhecida desde 1984, enquanto a agência que regula alimentos e medicamentos nos Estados Unidos (*Food and Drug Administration/FDA*) o classifica como “Geralmente Reconhecido Como Seguro” (status GRAS) desde 1986 e “seguro para os dentes” desde 1994 (LIMA e BERLINCK, 2003; SANTOS, 2004; SILVA *et al.*, 2011).

No Brasil, as propriedades funcionais de xilitol e outros polióis, como manitol e sorbitol, são reconhecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Considera-se que esses polióis, usados em gomas de mascar sem adição de sacarose, não produzem ácidos que danificam os dentes (ANVISA, 2008). O xilitol é considerado, pelo órgão brasileiro, um aditivo alimentar do tipo umectante, que pode ser empregado na quantidade necessária para obter o efeito desejado (“*quantum satis*”), uma vez que este não afeta a identidade e a genuinidade dos alimentos. Segundo Mussatto e Roberto (2002), o xilitol é extremamente bem tolerado, quando ingerido em doses com espaço de tempo e de no máximo 20g cada uma, sendo que a quantidade consumida não deve ser superior a 60g por dia, já que a ingestão de doses mais elevadas produz efeito laxativo.

Alguns estudos acerca da utilização de xilitol em composições alimentícias já foram realizados. Maia *et al.* (2008) elaboraram sorvetes de diversos sabores (nata, morango e chocolate) com xilitol em sua formulação e compararam os resultados com sorvetes preparados com sacarose. Concluíram que aqueles que possuíam sacarose foram mais bem aceitos pelos consumidores. Contudo, os sorvetes produzidos com xilitol tiveram aceitação satisfatória (obtendo para o aspecto geral dos sorvetes 91% para os sorvetes de morango, 88% para o sorvete de chocolate e 67% para o sorvete de nata, aceitabilidade esta considerada entre boa e ótima). Concluindo-se que estudos futuros podem colaborar para o desenvolvimento desse tipo de produto no setor alimentício.

Edelstein *et al.* (2008) utilizaram xilitol, manitol, maltitol, sucralose, estévia e isomalte (com substituição de até 100%) para produzir *cupcakes*, porém observaram que os *cupcakes* produzidos com os adoçantes tiveram diferenças de aparência, textura, maciez e sabor em relação aos produzidos com 100% de sacarose. Já Chen, Chen e Shiu (2008) desenvolveram um doce probiótico (com adição de *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium longuni*) contendo xilitol e sacarose como edulcorantes utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Esses autores observaram que os probióticos foram conservados por até dois meses e a presença dos edulcorantes utilizados auxiliou na textura e consistência dos doces.

Winkelhausena *et al.* (2007) desenvolveram *cookies* caseiros e compararam a aceitação desses produtos com produtos convencionais, isto é, com aqueles preparados com sacarose e glicose, concluindo que os produtos com xilitol tiveram boa estabilidade microbiológica e não observaram diferenças significativas em relação à doçura dos produtos. Sokmen e Gunes (2006) buscaram desenvolver chocolate com baixo teor de calorias substituindo a utilização da sacarose por adoçantes, como maltitol, isomalte e xilitol. Afirmaram, no entanto, que as propriedades do maltitol foram mais adequadas para esse tipo de produto. Fisker e Nissen (2006) avaliaram o efeito do uso de diferentes adoçantes em gomas de mascar com sabor de frutas, incluindo xilitol, sorbitol e manitol. Nesse estudo ressaltou-se que a utilização de xilitol foi vantajosa devido ao alto nível de doçura que proporcionou.

### 1.1.2 Xilitol e suas aplicações odontológicas

O uso de xilitol na indústria farmacêutica e de tratamento odontológico (Figura 1.2) é bastante difundido devido as suas propriedades anticariogênicas já comprovadas (MÄKINEN *et al.*, 2013). Numerosos estudos clínicos têm mostrado que a utilização contínua de xilitol pode reduzir o número de cáries em até 100% (BOND, 2012). Diversos estudos realizados (LEE, CHOI e KIM, 2012; CAMPUS *et al.*, 2013; MISRA, RAGHUWANSHI, e SAXENA, 2013) mostram a efetividade desse álcool-açúcar contra a formação de biofilmes bucais, principalmente contra a bactéria *Streptococcus mutans*. Lee; Choi e Kim (2012) avaliaram as características cariogênicas

do xilitol contra essa bactéria e levantaram a hipótese de que se deve a diminuição da expressão de glucosiltransferases nos micro-organismos testados. Já Tapiainen *et al.* (2004) indicam que o xilitol muda a estrutura das células microbianas, tornando o polissacarídeo que as envolve esparso e a sua parede celular difusa. O efeito preventivo do xilitol contra cáries ainda não foi completamente explicado, porém acredita-se que os micro-organismos, em contato com a pentose, são forçados a reduzir a acumulação intracelular de xilitol-5-fosfato, expelindo xilitol para o exterior celular através da parede celular (ASSEV, WALLER e ROLLA, 1996).

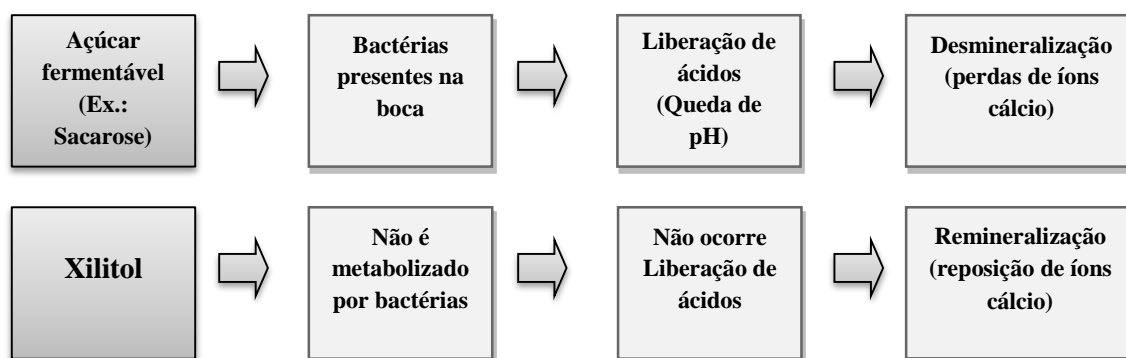
Além de *S. mutans*, estudos mostram a eficácia da utilização de xilitol contra outros micro-organismos prejudiciais à saúde bucal, como: *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (TAPIAINEN *et al.*, 2004), *Escherichia coli* ATCC 8739 e uma cepa de *E. coli* enteropatogênica (SILVA *et al.*, 2011), *Staphylococcus aureus* (AKIYAMA *et al.*, 2002; MITIĆ-ĆULAFIĆ *et al.*, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (AMMONS *et al.*, 2011) e *Burkholderia cepacia* (SAJJAN *et al.*, 2004).

**Figura 1.2:** Exemplos de produtos com xilitol em sua composição



Em adição ao combate a cáries, o xilitol é reconhecido por ser capaz de contribuir para a recalcificação dentária (Figura 1.3), que na maioria das vezes é importante no envelhecimento (IMAZATO *et al.*, 2006). Miake *et al.* (2011), por exemplo, comprovaram a eficiência de uma goma de mascar produzida com algas marinhas e xilitol na prevenção da desmineralização dental e observaram que a goma de mascar foi capaz de aumentar a resistência dos dentes aos ácidos presentes na boca. Esse mecanismo de calcificação também não está completamente esclarecido, mas acredita-se que em solução aquosa o xilitol entre em associação com o cálcio e iniba sua dissolução, protegendo, dessa forma, o esmalte dos dentes (ARENDS *et al.*, 1984). Miake *et al.* (2003) determinaram morfológicamente o efeito do xilitol na remineralização artificial do esmalte de dentes molares humanos, concluindo que essa substância é eficiente na remineralização profunda e média, porém não na superficial.

**Figura 1.3:** Mecanismo de formação de cáries e processo de remineralização dos dentes decorrente do consumo de xilitol.



**Fonte:** Adaptado de Mussatto e Roberto (2002)

### 1.1.3 Outras Aplicações

As duas principais aplicações de xilitol são em produtos alimentícios e odontológicos. Inicialmente o seu uso se deu em gomas de mascar sem açúcar para cães.

Contudo, com o aumento da demanda de pacientes com a necessidade de dietas com baixos níveis de carboidratos, muitos alimentos processados já contêm xilitol (PETERSON, 2013). Em adição as diversas aplicações em uso odontológico, prevenindo cáries e recalificando os dentes, o xilitol tem sido relatado como sendo eficiente para o tratamento de diversas doenças, como: diabetes (ISLAM, 2011), anemia (WANG; PATTERSON e VANEYS, 1971), otite média aguda (DANHAUER *et al.*, 2011), osteoporose (MATTILA; KANGASMAA; KNUUTTILA, 2005; MATTILA; SVANBERG; KNUUTTILA, 2001) e infecções respiratórias (DURAIRAJ *et al.*, 2007; SAJJAN *et al.*, 2004).

O xilitol possui um índice glicêmico significativamente mais baixo (13) se comparado com a sacarose (65) e glicose (100) e recentemente aumentou o interesse pela possibilidade desse açúcar-açúcar em combater a diabetes hiperglicêmica (ROVNER, NANSEL, e GELLAR, 2009). Islam (2011) examinou os efeitos globais do xilitol como substituto da sacarose em ratos e observou que a quantidade de triglicérides séricos foi diminuída nos animais alimentados com xilitol, o que reforça o potencial uso dessa substância como adoçante substituto da sacarose.

Wang, Patterson e Vaneys (1971) demonstraram que o xilitol pode ser utilizado para o tratamento de pacientes com episódio hemolítico grave. É, portanto, um agente terapêutico que pode ser utilizado em pessoas que tenham deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), suprindo a célula de NADPH<sub>2</sub>, por meio da oxidação de L-xilulose mantendo os glóbulos vermelhos íntegros.

Segundo Pereira *et al.* (2009), a patogênese da otite média aguda possui vários fatores e é muito comum na infância, sendo os tratamentos comumente utilizados baseados na prescrição de antibióticos. A aplicação de xilitol pode inibir o crescimento de *Streptococcus pneumoniae* e a interação entre essa bactéria e *Haemophilus influenzae*, um dos principais causadores da otite (UHARI; TAPIAINEN; KONTIOKARI, 2000). A utilização de xilitol no tratamento desse tipo de doença parece ter eficácia, porém é necessário ainda mais estudos em relação ao tempo de administração e dose ministrada (LEVI *et al.*, 2013).

A eficácia da utilização de xilitol no tratamento contra osteoporose foi comprovada por Mattila *et al.* (2005; 2001). Esses pesquisadores observaram que a

suplementação da dieta continuamente com xilitol leva a um aumento no volume ósseo e conteúdo mineral. O xilitol combate a osteoporose estimulando a absorção de cálcio pelo intestino e facilitando sua passagem do sangue para os ossos. O conteúdo de cálcio nos ossos é, assim, aumentado, diminuindo a necessidade de reabsorção.

As infecções bronco-pulmonares são uma das principais causas de morte infantil em pacientes com fibrose cística, a qual é caracterizada por infecções bacterianas nas vias aéreas. O xilitol nebulizado pode atuar contra essas contaminações de ordem microbiana e aumentar a quantidade de líquido nas vias aéreas (DURAIRAJ *et al.*, 2007). Além disso, já foi comprovado cientificamente que o xilitol pode inibir a aderência de micro-organismos capazes de causar problemas respiratórios, como *Burkholderia cepacia* (SAJJAN *et al.*, 2004).

## 2 PRODUÇÃO DE XILITOL

Atualmente a produção de xilitol se dá por via química, por meio de reações de hidrogenação da xilose, ou por via microbiológica, na qual micro-organismos específicos convertem xilose em xilitol (AHMAD, SHIM e KIM; PAL *et al.*, 2013).

Além desses dois processos, que há algumas décadas vêm sendo intensamente investigados, outro processo, o enzimático, tem aumentado o interesse dos cientistas. Esse processo é uma alternativa ao processo biotecnológico e que pode alcançar uma conversão de até 100%. Isso se deve a transformação direta de xilose em xilitol, a qual não pode ser alcançada em processos fermentativos devido ao desvio de xilose para manutenção celular. O processo enzimático consiste na redução direta de xilose em xilitol por meio da enzima xilose redutase (XR) assistida pela coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) (BRANCO, SANTOS e SILVA, 2011).

O xilitol pode ser obtido de fontes naturais, como vegetais (banana, alface, morango, couve flor, cenoura, ameixas, framboesas, espinafre e berinjela, entre outros), fungos ou líquens por extração sólido-líquido, mas como ele está presente em pequena proporção (menos de 900 mg em cada 100 g de matéria-prima), esse processo torna-se inviável economicamente (TAMANINI e HAULY, 2004).

O Brasil é conhecido por seu grande potencial de produção de recursos renováveis tais como produtos agrícolas, florestais e resíduos. Dentre os resíduos, pode-se citar o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de arroz, a palha de trigo, a casca de aveia e as aparas de madeira (MORAES *et al.*, 2014; TAMANINI e HAULY, 2004). Diferentes estudos são reportados na literatura em relação a utilização de resíduos lignocelulósicos para a produção de xilitol, como mostrado na Tabela 1.1 Isso coloca o país numa situação favorável a utilização desses diversos resíduos agroindustriais para produção de produtos com valor agregado, como no caso do xilitol.

A produção química de xilitol, apesar de ser ainda a forma industrial utilizada atualmente, vem dando espaço a pesquisas com a produção biotecnológica, o que é abordado nos dois tópicos seguintes.

**Tabela 1.1:** Exemplos de materiais lignocelulósicos utilizados em estudos para produção de xilitol.

<b>Tipos de Substratos Lignocelulósicos</b>	<b>Referências</b>
Bagaço de cana	Arruda <i>et al.</i> (2011);
Caules de girassol	Martínez, Sánchez e Bravo (2012)
Colmo de bambu	Miura <i>et al.</i> (2013)
Farelo de arroz	EL-Baz, Shetaia, e Elkhoulí (2011)
Gramma hidrolisada	West (2009)
Palha de centeio	Franceschin <i>et al.</i> (2011)
Palha de milho	Rodrigues, Kenealy, e Jeffries (2011)
Palha de trigo	Zhuang <i>et al.</i> (2011)
Resíduos da madeira	Ko <i>et al.</i> (2008)
Resíduos de grãos de cervejaria	Carvalho <i>et al.</i> (2007)
Resíduos de poda de oliveira	García <i>et al.</i> (2011); Mateo <i>et al.</i> (2013)
Resíduos de videira	Diéguez <i>et al.</i> (2011)
Resíduos hortícolas	Zhang <i>et al.</i> (2012)
Sabugo de milho	Li <i>et al.</i> ; Ling <i>et al.</i> (2011); Ping <i>et al.</i> (2013)
Serragem de madeira	Rafiqul e Sakinah (2012)

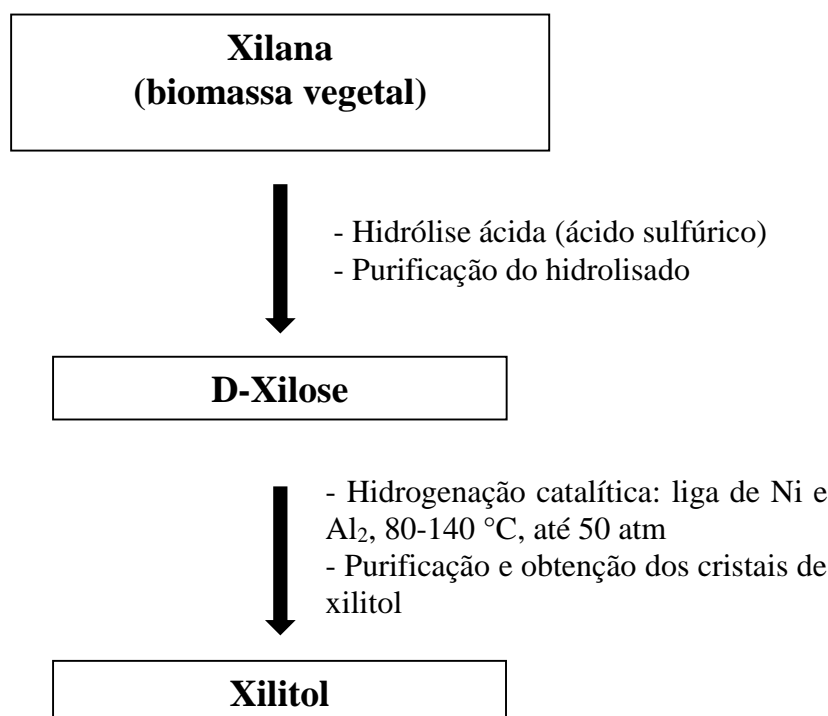
## 2.1 Produção de xilitol por via química

A produção de xilitol por via química em escala industrial teve início em 1975, na Finlândia, com a Finnish Sugar Co. Ltda., em Helsink. Esse processo, que fornece de 50 a 60% de rendimento de xilitol, é realizado em reatores com elevadas pressões (31-40 atm) e temperaturas (100-130 °C) e tem um tempo de duração de 3 a 5 horas, dependendo das condições de temperatura e pressão empregadas (JAFÉ *et al.*, 1974; MELAJA e HÄMÄLÄINEN, 1977). As altas temperaturas e altas pressões utilizadas, sem contar as várias etapas de purificação requeridas, tornam o processo de



obtenção de xilitol muito caro e por esse motivo buscam-se novas maneiras de produção que possam ser tão eficientes quantos os modos tradicionais (SANTOS *et al.*, 2008). Atualmente, a maior produtora de xilitol é a Danisco Company, uma empresa dinamarquesa que utiliza madeiras ou milho, fornecidos principalmente da China e por meio de hidrogenação xilitol é produzido (FRANCESCHIN *et al.*, 2011).

**Figura 1.4:** Processo de obtenção do xilitol por via química



A produção em larga escala se dá pelo processo químico, apesar de diversas pesquisas apontarem para a potencialidade de métodos biotecnológicos. Esse processo inclui cinco etapas, como está resumido na Figura 1.4: 1. Hidrólise ácida do material natural rico em xilana; 2. Purificação do hidrolisado até obter-se uma solução de xilose pura; 3. Hidrogenação catalítica da xilose pura a xilitol, com um catalisador (liga de Ni e Al<sub>2</sub>); 4. Purificação da solução de xilitol obtida; 5. Cristalização do xilitol (MELAJA e HÄMÄLÄINEN, 1977; HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982).

## 2.2 Produção biotecnológica de xilitol

A produção biotecnológica de xilitol pode ser potencialmente menos dispendiosa e, por isso, tem se revelado vantajosa em relação ao processo químico utilizado convencionalmente. Biotecnologicamente utilizam-se diversos micro-organismos, incluindo fungos filamentosos e bactérias, sendo as leveduras (ou suas enzimas isoladas) objeto principal das pesquisas atuais. A Tabela 1.2 apresenta diversas espécies de leveduras recentemente utilizadas na produção de xilitol

Okamoto *et al.* (2012), em estudos para produção de etanol a partir de xilose, sob condições diversas (aeróbicas, de oxigênio limitante e anaeróbicas), observaram a formação de xilitol no meio fermentativo com o fungo filamentoso *Neolentinus lepideus* RS1911, sendo a maior concentração de xilitol obtida ( $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ ) em condições anaeróbicas de fermentação. Contudo, estudos com fungos filamentosos para produção de xilitol são escassos na literatura, mas alguns pesquisadores relatam resultados positivos quanto a produção com as espécies *Hypocrea jecorina* (BERGHÄLL *et al.*, 2007) e *Malbranchea pulchella* (BANERJEE; ARCHANA; SATYANARAYANA, 1994).

A literatura também aponta, mesmo que em menor número, a capacidade de algumas bactérias para produzir xilitol. Rangaswamy e Agblevor (2002) selecionaram 17 culturas bacterianas dos gêneros *Serratia*, *Cellulomonas* e *Corynebacterium* com potencial para produção de xilitol, sendo que *Corynebacterium* sp. B-4247 foi a cepa com maior produção ( $10,05 \text{ g.L}^{-1}$  após 150 h). Uma estirpe de *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 foi capaz de produzir  $29,2 \text{ g.L}^{-1}$  de xilitol a partir de  $52,4 \text{ g.L}^{-1}$  de D-arabitol após 27h de incubação. Um aumento da produção para  $51,4 \text{ g.L}^{-1}$  de xilitol foi observada com a adição de etanol (5% v/v) e  $5 \text{ g.L}^{-1}$  D-glicose ao meio de fermentação (SUZUKI *et al.*, 2002).

**Tabela 1.2:** Leveduras utilizadas na produção de xilitol.

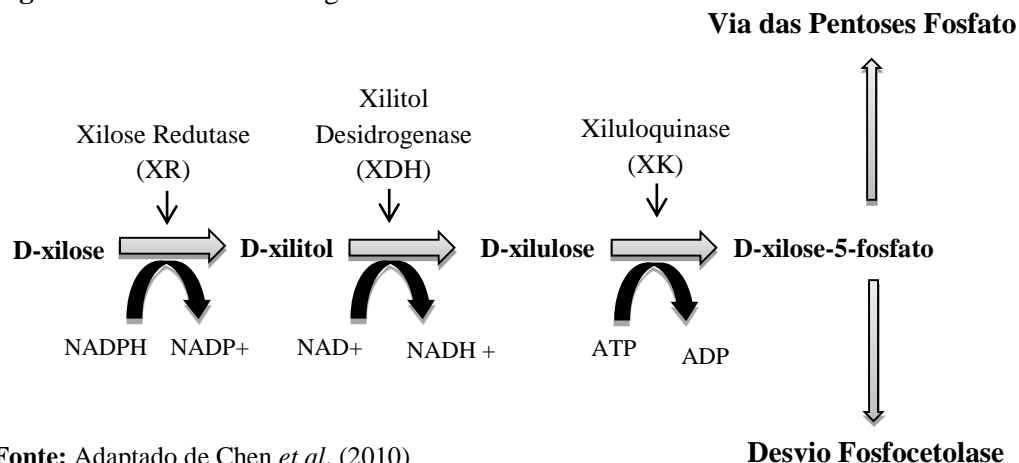
Micro-organismo	Referência	Micro-organismo	Referências
<i>Candida tropicalis</i> CCTCC M2012462	Ping <i>et al.</i> (2013)	<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7426	Pérez-Bibbins <i>et al.</i> (2013)
<i>C. athensensis</i> SB18	Zhang <i>et al.</i> (2012)	<i>D. hansenii</i>	Prakash <i>et al.</i> (2011)
<i>C. boidinii</i> BCRC 21 432	Ko <i>et al.</i> (2008)	<i>D. hansenii</i> CCM1 941	Carvalho <i>et al.</i> , (2007)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	Arruda <i>et al.</i> (2011)	<i>D. hansenii</i> ,	Diéguez <i>et al.</i> (2011)
<i>C. tropicalis</i>	Misra <i>et al.</i> (2012)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Wilkins <i>et al.</i> (2008)
<i>C. tropicalis</i>	EL-Baz, Shetaia, e Elkhoul (2011)	<i>K. marxianus</i> CE025	Rocha <i>et al.</i> (2011)
<i>C. tropicalis</i> As 2.1776	Li <i>et al.</i> (2011)	<i>Pichia guilliermondii</i>	Zou <i>et al.</i> (2010)
<i>C. tropicalis</i> HDY-02	Ling <i>et al.</i> (2011)	<i>P. stipitis</i> YS-30	Rodrigues, Kenealy, e Jeffries (2011)
<i>C. tropicalis</i> JH030	Huang <i>et al.</i> (2011)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Bura, Vajzovic e Doty (2012)
<i>C. tropicalis</i> NBRC 0618	García <i>et al.</i> (2011)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Chen <i>et al.</i> (2010)
<i>C. tropicalis</i> W103	Cheng <i>et al.</i> (2009)	<i>S. cerevisiae</i> D452-2	Wei <i>et al.</i> (2013)

Ortiz *et al.* (2013) realizaram uma revisão de literatura a respeito da utilização de bactérias ácido lácticas (BAL) para a produção de diversos polióis, incluindo xilitol, e concluíram que essas bactérias podem produzir naturalmente eritritol e manitol sob certas condições de cultivo, entretanto para a produção de xilitol e sorbitol é necessário a utilização de técnicas de engenharia metabólica para modificação genética dos micro-organismos.

*Escherichia coli*, uma bactéria extensivamente estudada inclusive em estudos genéticos, também foi relatada como sendo capaz de produzir xilitol. Cirino *et al.* (2006) descreveram a produção de xilitol a partir de uma mistura de glicose-xilose utilizando *E. coli* W3110 modificada geneticamente, alcançando produção de até 38 g.L<sup>-1</sup> de xilitol. Outros micro-organismos modificados geneticamente também se mostraram promissores para produção de xilitol, como as espécies bacterianas *Bacillus subtilis* (POVELAINEN e MIASNIKOV, 2007) e *Corynebacterium glutamicum* (SASAKI, JOJIMA e INUI, 2010). Mesmo com a diversidade de micro-organismos capazes de produzir xilitol, as leveduras são os principais produtores, sendo, portanto, extensivamente utilizadas em estudos relacionados a esse processo.

As leveduras produzem xilitol como um intermediário durante o metabolismo da D-xilose (Figura 1.5). A xilose redutase (XR) é tipicamente uma enzima dependente de NADPH, enquanto xilitol desidrogenase (XDH) requer NADP<sup>+</sup>. Dessa forma, a conversão do D-xilitol ocorre em duas etapas, uma de redução seguida por outra de oxidação. D-xilulose é primeiramente reduzida a D-xilitol por NADPH e posteriormente esse metabólito é oxidado a D-xilulose por NADP<sup>+</sup>. Essas duas reações são consideradas limitantes na fermentação de D-xilose e produção de xilitol.

**Figura 1.5:** Via metabólica geral de D-xilose em leveduras.



Fonte: Adaptado de Chen *et al.* (2010)

Em muitos casos, sob condições microaeróbicas, leveduras são capazes de transformar resíduos contendo D-xilose em etanol ou xilitol. Essa produção varia de acordo com o micro-organismo em questão, sugerindo uma regulação de vários níveis (YABLOCHKOVA; BOLOTNIKOVA; MIKHAILOVA, 2003a). A literatura apresenta diversas pesquisas a respeito da produção de xilitol por meio do metabolismo microbiano. Dentre os gêneros capazes de produzir xilitol, *Candida* sp. é um dos mais extensivamente estudados (TADA, KANNO e HORIUCHI, 2012; AHMAD, SHIM E KIM, 2013) e se mostra um micro-organismo promissor no que concerne a produção de xilitol.

*Candida guilliermondii*, assim como outras espécies microbianas, possui um sistema metabólico com XR dependente de NADPH e XDH dependente de NAD<sup>+</sup> como cofatores e essas enzimas são induzidas por xilose (SENE *et al.*, 2000). Arruda *et al.* (2011) afirmam, por meio de suas pesquisas, que com esse micro-organismo previamente cultivado em meio contendo xilose e glicose a atividade das enzimas XR e XDH é aumentada. Em leveduras da espécie *Candida* a disponibilidade de oxigênio é o fator mais importante na produção de xilitol a partir de D-xilose. Sob condições limitadas de oxigênio, a fosforilação oxidativa não é possível reoxidar todos os NADH gerados. Assim, a concentração intracelular de NADH aumenta e resulta na acumulação de xilitol. A Tabela 1.3 mostra a atividade de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) em algumas leveduras. Yablochkova, Bolotnikova e Mikhailova (2003a) estudaram a atividade de XR e XDH em 11 diferentes espécies de leveduras

(incluindo os gêneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis* e *Pachysolen*). Observou-se que a cepa *C. tropicalis* Y-456 teve a mais alta atividade específica de XR [6,57  $\mu$  mol/(min.mg<sub>proteína</sub>)]. Diante do que relata a literatura, micro-organismos com alta atividade de XR e NADPH-dependente são potencialmente produtoras de xilitol a partir de D-xilose. Os mesmos autores ressaltam ainda, após pesquisas, que leveduras utilizam preferencialmente hexoses na glicólise e, portanto, a presença de glicose juntamente com D-xilose inibe a produção de xilitol no meio de fermentação (YABLOCHKOVA; BOLOTNIKOVA; MIKHAILOVA, 2003b). A literatura mostra valores variáveis para a produção de xilitol por via biotecnológica com a utilização de leveduras a partir de resíduos agroindustriais conforme Tabela 1.3.

**Tabela 1.3:** Atividades específicas de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) em algumas leveduras.

Cepas de espécies de leveduras	Atividade específica $\mu$ mol/(min.mg <sub>proteína</sub> )			
	Xilose redutase		Xilitol desidrogenase	
	NADPH	NADH	NAD <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>
<i>Candida didensiae</i> , F-3	0,63	0,03	0,40	<0,01
<i>Candida intermediae</i> , TabII (85)	4,74	0,16	3,62	0,21
<i>Candida parapsilosis</i> , 42	0,90	0,04	0,01	<0,01
<i>Candida silvanorum</i> , VGI-II	5,10	0,26	4,11	0,21
<i>Candida tropicalis</i> , Y-456	6,43	0,14	1,10	0,06
<i>Kluyveromyces marxianus</i> , Y-488	0,16	<0,01	0,04	<0,01
<i>Pichia guilliermondii</i> , Y-1017	0,61	0,02	0,18	<0,01
<i>Torulopsis molishiana</i> , 55	0,11	<0,01	0,01	<0,01
<i>Candida shehatae</i> , Y-1632	3,40	4,93	13,53	0,42
<i>Pichia stipitis</i> , Y-2160	4,84	10,37	8,37	0,27

**Fonte:** Adaptado de Yablochkova, Bolotnikova e Mikhailovam, 2003a.

Como a xilose redutase é uma oxidorredutase que catalisa a redução de D-xilose em xilitol com NADPH como doadores de átomos de hidrogênio. Observa-se, na Tabela 1.3, que as leveduras com maior atividade de xilose redutase foram *C. tropicalis*, *C. silvanorum* e *C. intermediae*, sendo, portanto, as leveduras com maior potencial para a produção de xilitol.

### 3 CONDIÇÕES DE CULTIVO MICROBIANO VISANDO À PRODUÇÃO DE XILITOL

Diversos fatores podem influenciar no crescimento microbiano e para que esse seja ótimo essas condições devem ser ajustadas de acordo com especificidade de cada micro-organismo. Os fatores de crescimento microbiano mais extensivamente estudados e que mais influenciam em bioprocessos são: temperatura, pH, taxa de aeração, concentração do inóculo e nutrientes (fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas, etc.). Um controle adequado dessas variáveis é de grande importância para uma boa performance do processo de obtenção de produtos com elevada eficiência e alta qualidade. Diversos são os estudos das condições ambientais ótimas para o crescimento de leveduras para produção biotecnológica de xilitol e estão abordados a seguir.

#### 3.1 pH e temperatura

A maioria das pesquisas utilizando leveduras em processos biotecnológicos para a produção de xilitol tem sido realizada ajustando-se a temperatura para igual ou acima de 30 °C (CASTRO *et al.*, 2013; MISRA, RAGHUWANSHI e SAXENA, 2013; PING *et al.*, 2013).

Em alguns casos, temperaturas mais elevadas podem ser empregadas, por exemplo, devido à característica de termotolerância da levedura *Kluyveromyces marxianus* faz com que ela se destaque nos estudos fermentativos em relação a outros micro-organismos, pois além das reações enzimáticas serem aceleradas, diminui-se o risco de contaminação por outros micro-organismos (NONKLANG *et al.*, 2008). Rodrussamee *et al.* (2011) estudaram o potencial de *K. marxianus* DMKU3-1042 para produção de etanol e xilitol a altas temperaturas (30, 40 e 45 °C) utilizando açúcares presentes em hemicelulose hidrolisada como fonte de carbono. O crescimento celular e o consumo de açúcares foram observados para todas as temperaturas estudadas, indicando que a cepa pode crescer a altas temperaturas. Ressalta-se que o crescimento celular, mesmo não cessando, teve intensidade diminuída de acordo com o aumento da temperatura. A 30 °C a produção de etanol em 72h foi de 2,5 g.L<sup>-1</sup>, enquanto a produção de xilitol em 48h de processo foi de 4,3 g.L<sup>-1</sup>. A produção de xilitol foi favorecida a 40 °C, onde se observou uma produção de 7,0 g.L<sup>-1</sup>.



Três cepas de *K. marxianus* (IMB2, IMB3 e IMB4), isoladas em uma destilaria indiana, foram caracterizadas pelo crescimento em xilose em altas temperaturas (40 e 45 °C) e em diferentes pH (4,5; 5,0 e 5,5). Observou-se que a temperatura mais baixa (40 °C), em pH 5,5, foi melhor para o rendimento de etanol e xilitol, alcançando-se com a linhagem IMB4, em 96h, produção de 2,08 e 7,36 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente (WILKINS *et al.*, 2008). Já a temperatura ótima para o crescimento de *Kluyveromyces* sp. IPE453 foi de 50 °C, em pH 5,0, alcançando produção máxima em de etanol e xilitol, em 48 h, de 82 g.L<sup>-1</sup> e 11,5 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente (KUMAR *et al.*, 2009b).

Srivani e Setty (2012) buscaram encontrar condições ambientais ótimas para a produção de xilitol por *Candida parapsilosis* NCIM-3323, estudando a variação de temperatura (de 25 a 35 °C) e o pH inicial (de 3 a 6). Na faixa de pH inicial estudada, observou-se que a produtividade de xilitol aumentou quando o valor de pH inicial era de 3,5. Acima desse pH houve o decréscimo da produção. Nas temperaturas estudadas, observa-se que a produtividade de xilitol foi aumentada até a temperatura atingir 30 °C e a partir dessa temperatura ocorre uma queda na produção. Ramesh *et al.* (2013) investigaram a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho por *Debaryomyces hansenii* var *hansenii* (MTTC 3034) por meio de uma otimização estatística de superfície de resposta. Nesse estudo a temperatura e pH ótimos para a produção do poliálcool foram de 31,8 °C e 7,25, respectivamente.

Com *Candida tropicalis* diversos estudos consideram temperaturas de 30-35 °C para produção de xilitol. Ping *et al.* (2013), por exemplo, utilizaram *C. tropicalis* CCTCC M2012462 para produção de xilitol a partir de hidrolisado de sabugo de milho a 35 °C, alcançando 38,8 g.L<sup>-1</sup> em 84h de fermentação. Misra, Raghuwanshi e Saxena, (2013) também utilizaram hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho como substrato, conduziram o ensaio fermentativo com uma estirpe de *C. tropicalis* alcançando 11,89 g.L<sup>-1</sup> de xilitol a 30 °C. EL-Baz, Shetaia e Elkhoul (2011) analisaram a produção de xilitol em meios sintéticos a 30 °C por *C. tropicalis* obtendo uma produção máxima de 36,25 g.L<sup>-1</sup>.

### 3.2 Aeração

As leveduras não formam um grupo homogêneo em relação ao seu rendimento energético. O destino do piruvato, um intermediário glicolítico, determina o tipo de metabolismo. Quando todo piruvato produzido é convertido pela via dos Ácidos Tricarboxílicos (respiração), ocorre o metabolismo oxidativo. Quando o piruvato é reduzido a etanol ou outros compostos, ocorre metabolismo oxirredutivo (fermentação), sendo que as duas vias podem ocorrer simultaneamente (GONZÁLEZ-SISO *et al.*, 2000). Alguns gêneros, preferencialmente, possuem o metabolismo direto para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e geração de energia ótima, assim, são capazes de realizar fermentação e respiração simultaneamente e o equilíbrio específico entre essas duas vias depende de cada cepa (MERICO *et al.*, 2007).

A aeração é vista como um dos principais fatores experimentais para produção de xilitol, sendo a quantidade de fornecimento de oxigênio que determina se D-xilose será fermentada ou entrará no ciclo respiratório, regulando o equilíbrio do consumo de carbono para bioconversão e crescimento (EL-BAZ, SHETAIA, e ELKHOULI, 2011). É evidente que as leveduras requerem pequena oxigenação do meio de cultivo, para a redução de D-xilose, e apresentam taxas específicas para cada espécie (EL-BAZ, SHETAIA, e ELKHOULI, 2011; SANTOS *et al.*, 2005).

Para utilizar e fermentar a xilose, essa deve ser convertida em xilulose, então a xilulose é fosforilada em xilulose 5-fosfato por xiluloquinase (XK) e essa última é metabolizada pela rota das pentoses fosfato. Em bactérias, a D-xilose é convertida a D-xilulose diretamente, por xilose isomerase (XI). Em eucariotos, como em leveduras e fungos filamentosos, D-xilose é convertida em D-xilulose por meio de redução e oxidação, que são catalisadas por xilose redutase (XR) e xilitol dehidrogenase (XDH). O principal fator limitante nesse processo é o desequilíbrio redox, que é causado pela diferença na preferência de coenzimas de XR (NADPH) e XDH (NAD<sup>+</sup>). Esse desequilíbrio redox é a razão chave para a atividade pela qual a levedura acumula xilitol durante o cultivo anaeróbio (Figura 1.2) (ZHANG *et al.*, 2012).

Sirisansaneeyakul, Wannawilai e Chisti (2013) estudaram a produção de xilitol em batelada alimentada por *Candida magnoliae* TISTR 5663 em condições limitadas de oxigênio (1 vvm). Os rendimentos de xilitol, 0,727, 0,719 e 0,720 g de xilitol por g de xilose e glicose, foram obtidos com concentrações de biomassa média de

21, 48 e 50 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, sob a condição avaliada (velocidade de agitação 300 rpm, pH 7,0 e 30 °C). EL-Baz, Shetaia, e Elkhoul (2011), por sua vez, avaliaram o potencial de *Candida tropicalis* em meio sintético contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de xilose como fonte de carbono e concluíram que a produção de xilitol aumentou quando se reduziu a oxigenação do meio (dobrando-se o volume de meio no frasco Erlenmeyer (250 mL) de 20 para 40 mL). Mussatto e Roberto (2004) investigaram a produção de xilitol em biorreator por *C. guilliermondii* FTI 20037 a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz sob diferentes taxas de agitação (200, 300 e 500 rpm). Esses pesquisadores concluíram que a bioconversão de xilose em xilitol pela levedura depende da velocidade de agitação, sendo a produtividade máxima alcançada ( $Y_{P/S} = 0,84 \text{ g.g}^{-1}$ ) a 300 rpm de agitação.

### 3.3 Fontes de carbono

A utilização de materiais lignocelulósicos para a produção de bioprodutos de alto valor é promissora, pois estas representam uma fonte abundante e renovável de fontes de carbono. Materiais lignocelulósicos, como sabugo de milho, palha de arroz, bagaço de cana, bagaço de caju, pó de madeira, casca de aveia, dentre outros, representam uma importante e barata fonte de substratos microbianos. A fração hemicelulósica pode ser hidrolisada a xilose e, em seguida, ser fermentada a xilitol (ZOU *et al.*, 2010). A Tabela 1.4 apresenta diferentes estudos que utilizaram hidrolisados de materiais lignocelulósicos como fonte de carbono para a produção de xilitol.

Os hidrolisados hemicelulósicos contêm várias hexoses e pentoses, tais como glucose, manose, frutose e, apesar de haver variação na composição desses hidrolisados, xilose, glicose e arabinose são os três principais açúcares presentes. Uma estratégia empregue na produção biotecnológica de xilitol é a utilização de glicose e arabinose para fornecimento de energia requerida para o crescimento microbiano, enquanto a xilose pode ser assimilada para a produção de xilitol. Na presença de glicose, muitos outros açúcares, tais como xilose e arabinose, não podem ser metabolizados pela maioria dos micro-organismos até que a glicose presente seja completamente consumida. Este regulamento, chamado repressão catabólica de carbono

(RCC), impede a absorção e catabolismo de fontes de carbono menos favoráveis (SU *et al.*, 2013).

Diversos estudos avaliam a utilização de sabugo de milho hidrolisado como fonte de carbono para produção de xilitol. Kamat *et al.* (2013) isolaram uma linhagem de levedura, *Cyberlindnera (Williopsis) saturnus*, a partir de florestas de manguezais que foi capaz de produzir xilitol ( $29,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) a partir de hidrolisado de sabugo de milho destoxificado ( $65 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose,  $13 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e  $6,3 \text{ g.L}^{-1}$  de arabinose.). A produção de xilitol iniciou-se apenas com 48h de fermentação e perdurou até 144h, já a utilização de glicose foi prioritária nas primeiras horas de incubação do micro-organismo, sendo completamente assimilada até 24h. Misra, Raghuwanshi e Saxena (2013) também estudaram o potencial de sabugo de milho hidrolisado para produção de xilitol por uma cepa de *C. tropicalis*. Esses autores alcançaram extração máxima de xilose de  $20,92 \text{ g.L}^{-1}$  utilizando ácido sulfúrico 1% v/v. Concentrando-se o hidrolisado até  $52,71 \text{ g.L}^{-1}$  em relação a xilose, obteve-se  $15,19 \text{ g.L}^{-1}$  de xilitol em 60h de fermentação. Ping *et al.* (2013) utilizaram hidrolisado concentrado não destoxificado de sabugo de milho para produção de xilitol por *Candida tropicalis* CCTCC M2012462 alcançando produção máxima de  $38,8 \text{ g.L}^{-1}$  de xilitol.

Palha de cevada foi avaliada quanto à utilização para produção de xilitol por *Trichoderma reesei* geneticamente modificada (DASHTBAN *et al.*, 2013). Testaram-se dois métodos de hidrólise da matéria-prima (por organosolventes e com adição de NaOH). A produção de xilitol mais elevada ( $13,22 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi alcançada com a utilização de palha de cevada tratada por organosolventes com adição de 2% de xilose. Hidrolisado ácido de colmo de bambu ( $19 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose) destoxificado foi fermentado por *C. magnoliae* FERM P-16522. Os autores concluíram que essa matéria-prima possui potencial para ser aproveitada na produção de xilitol, alcançando concentração máxima de  $10,5 \text{ g.L}^{-1}$  do poliol (MIURA *et al.*, 2013).

Martínez, Sánchez e Bravo (2012) investigaram a produção de xilitol e etanol por *Hansenula polymorpha* a partir de caule de girassol hidrolisado com ácido fosfórico. Os resultados dessa pesquisa mostraram que para uma concentração inicial de açúcares redutores totais de  $13,3 \text{ g.L}^{-1}$  que foi obtida, o rendimento de xilitol e etanol foram de  $0,023 \text{ g.g}^{-1}$  e  $0,14 \text{ g.g}^{-1}$ , respectivamente. Rocha *et al.* (2011), em estudo sobre a produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de caju não destoxificado ( $29,08 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose,  $24,48 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose,  $11,33 \text{ g.L}^{-1}$  de arabinose e  $2,90 \text{ g.L}^{-1}$ ) observaram

a produção paralela de xilitol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* CE025. A maior produção de xilitol ocorreu às 72h de fermentação, atingindo uma concentração de 4,77 g.L<sup>-1</sup>.

Algumas pesquisas recentes também se dedicaram a avaliar a produção de xilitol em meios sintéticos contendo xilose como principal fonte de carbono. Srivani e Setty (2012) estudaram a otimização de parâmetros (pH, temperatura e concentração inicial de xilose) para produção de xilitol a partir da fermentação da xilose por *Candida parapsilosis* NCIM-3323. Concluíram que a produção máxima de xilitol (28,14 g.L<sup>-1</sup>) se deu com os seguintes valores para pH, temperatura e concentração inicial de xilose: 3,5; 30 °C e 60 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Vajzovic *et al.* (2012) utilizaram meio sintético (contendo glicose ou xilose, 30 g.L<sup>-1</sup>) para avaliar a produção de xilitol na presença de alguns inibidores (furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido acético). Os resultados apontaram que altas concentrações dos inibidores (acima de 3 g.L<sup>-1</sup>) afetaram negativamente a produção do xilitol.

### 3.4 Fontes de Nitrogênio

Diversas fontes de nitrogênio são investigadas em estudos biotecnológicos para otimizar o crescimento de micro-organismos e produção de metabólitos de interesse. Dentre as fontes orgânicas mais analisadas encontram-se peptona, extrato de levedura e ácido casamino (AHMAD, SHIM e KIM, 2013; CASTRO *et al.*, 2013). Já entre as fontes inorgânicas estão sulfato e fosfato de amônio, nitrato de sódio e ureia (BURA, VAJZOVIC e DOTY, 2012; MIURA *et al.*, 2013).

Muitas são as pesquisas que investigam a influência da utilização de ureia, como fonte de nitrogênio, para a produção de xilitol. Rodrigues, Kenealy e Jeffries (2011) averiguaram os efeitos da suplementação do hidrolisado de palha de milho com as fontes de nitrogênio, ureia e sulfato de amônio, na concentração de 5 g.L<sup>-1</sup> na produção de xilitol por *Pichia stipitis* YS-30. Observou-se que utilizando a ureia ao invés de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aumentou-se o consumo de xilose e a taxa de produção de xilitol em 25 e 34%, respectivamente.

Ko *et al.* (2008) estudaram a produção de xilitol por fermentação de resíduos de madeira. Testou-se a utilização de ureia como fonte de nitrogênio, substituindo-se extrato de levedura por 10g de ureia ou 10g de farelo de soja. O

rendimento ( $Y_{P/S}$ ) obtido com a utilização de ureia foi 1,3 vezes maior do que o obtido com extrato de levedura num período posterior de temperatura. Zhang *et al.* (2012), buscando a produção de etanol e xilitol por *Candida athensensis* SB18 a partir de resíduos hortícolas, suplementaram o meio de produção com  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de ureia. Variações significativas nos parâmetros de crescimento em biomassa e produção de xilitol foram observadas. A cepa utilizou ureia, preferencialmente, como fonte de nitrogênio e demonstrou alta conversão de xilose em xilitol, que foi completamente consumida em 108h de fermentação. A concentração celular mais elevada e produção de xilitol foram de  $12,07 \text{ g.L}^{-1}$  e  $112,27 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Os resultados indicaram que, dentre as fontes de nitrogênio investigadas, ureia é a mais promissora para a cepa em estudada.

Em contra partida, Hongzhi *et al.* (2011) realizaram um planejamento estatístico experimental para otimizar um meio de cultura para produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de milho. As fontes de nitrogênio utilizadas nos experimentos foram nitrato de amônio, peptona, ureia, sulfato de amônio e extrato de levedura. Dessas fontes, apenas  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e extrato de levedura tiveram influência significativa, sendo a concentração ótima desses componentes de  $5,0 \text{ g.L}^{-1}$  e  $4,6 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. A produção de xilitol em batelada alimentada, em 78h de fermentação, foi de  $58 \text{ g.L}^{-1}$ .

A Tabela 1.4 mostra dados sobre a produção biotecnológica de xilitol a partir de diferentes resíduos lignocelulósicos assim como os valores dos parâmetros utilizados nos processos citados.

**Tabela 1.4:** Produção de xilitol por diferentes cepas de leveduras a partir de resíduos lignocelulósicos (Continua).

Micro-organismo	Resíduo	Condições gerais de incubação			Máxima produção de xilitol (g/L)	Referência
		pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)		
<i>C. athensensis</i> SB18	Resíduos hortícolas	7,0	30,0	102	100,1	Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>C. guilliermondii</i> FTI20037	Bagaçõ de cana	5,5	30,0	120	50,5	Arruda <i>et al.</i> , 2011
<i>C. guilliermondii</i> FTI20037	Palha de arroz	-	30,0	116	66,1	Mussatto e Roberto, 2002
<i>C. guilliermondii</i> FTI20037	Cavacos de eucalipto	5,8	30,0	96	7,61	Canettieri <i>et al.</i> , 2002
<i>C. tropicalis</i>	Farelo de arroz	5,5	30,0	72	36,3	EL-Baz, Shetaia, e Elkhoulì, 2011
<i>C. tropicalis</i> As2.1776	Sabugo de milho	5,5	30,0	96	58,3	Li <i>et al.</i> 2011
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	Grama hidrolisada	5,0	30,0	120	18,0*	West, 2009
<i>C. tropicalis</i> BCRC 20520	Resíduo de pó de madeira	5,0	30,0	96	41,1	Ko <i>et al.</i> , 2008
<i>C. tropicalis</i> HDY-02	Sabugo de milho	7,0	35,0	78	58,0	Hongzhi <i>et al.</i> , 2011

**Tabela 1.4:** Produção de xilitol por diferentes cepas de leveduras a partir de resíduos lignocelulósicos. (Continuação).

<i>C. tropicalis</i> JH030	Palha de arroz	6,0	30,0	80	31,1	Huang <i>et al.</i> 2011
<i>C. tropicalis</i> NBRC 0618	Resíduos de poda de oliveira	5,0	30,0	25	53*	García <i>et al.</i> , 2011
<i>C. tropicalis</i> W103	Sabugo de milho	6,0	35,0	64	45,4	Cheng <i>et al.</i> , 2009
<i>C. magnoliae</i>	Colmo de bambu	-	30,0	30	19,0	Miura <i>et al.</i> , 2013
<i>D. hansenii</i>	Bagaço de cana	6,0	40,0	156	68,6	Prakash <i>et al.</i> , 2011
<i>D. hansenii</i> CCM1 941	Grãos de cervejaria	5,5	30,0	72	24,0	Carvalho <i>et al.</i> , 2007
<i>D. hansenii</i> NRRL Y-7426	Resíduos de videira	6,0	30,0	116	27,5	Diéguez <i>et al.</i> , 2011
<i>K. marxianus</i> CE 025	Bagaço de caju	4,5	40,0	72	4,8	Rocha <i>et al.</i> , 2011
<i>P. stipitis</i> NRRL Y-30785	Palha de milho	5,6	30,0	72	12,5	Rodrigues, Kenealy, e Jeffries (2011)



## **4 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE XILITOL**

### **4.1 Produção de biomassa lignocelulósica**

Observa-se um crescente aumento do interesse científico, devido às necessidades globais por busca de energias renováveis, da utilização de novas fontes energéticas, como aquelas oriundas das atividades agrícolas. Atualmente, a biomassa existente é destaque como uma fonte promissora de energia renovável devido aos danos ambientais causados pela combustão de combustíveis fósseis bem como seu futuro esgotamento (CHOI, CHOI e PARK, 2012).

Biomassa lignocelulósica, representa uma fonte de matéria-prima renovável, abundante e barata (BRIONES, SERRANO e LABIDI, 2012), sendo que lignocelulose corresponde a maior porcentagem da constituição de biomassa terrestre, compreendendo cerca de metade do material vegetal produzido pela fotossíntese, o que representa o mais abundante recurso orgânico no solo. Essa biomassa consiste em três tipos de polímeros (celulose, hemicelulose e lignina) que são fortemente entrelaçados e quimicamente ligados por forças não covalentes e por ligações cruzadas covalentes (PÉREZ *et al.*, 2002). A Figura 1.6 representa a estrutura da biomassa lignocelulósica bem como a mesma pode ser utilizada até a obtenção de xilitol.

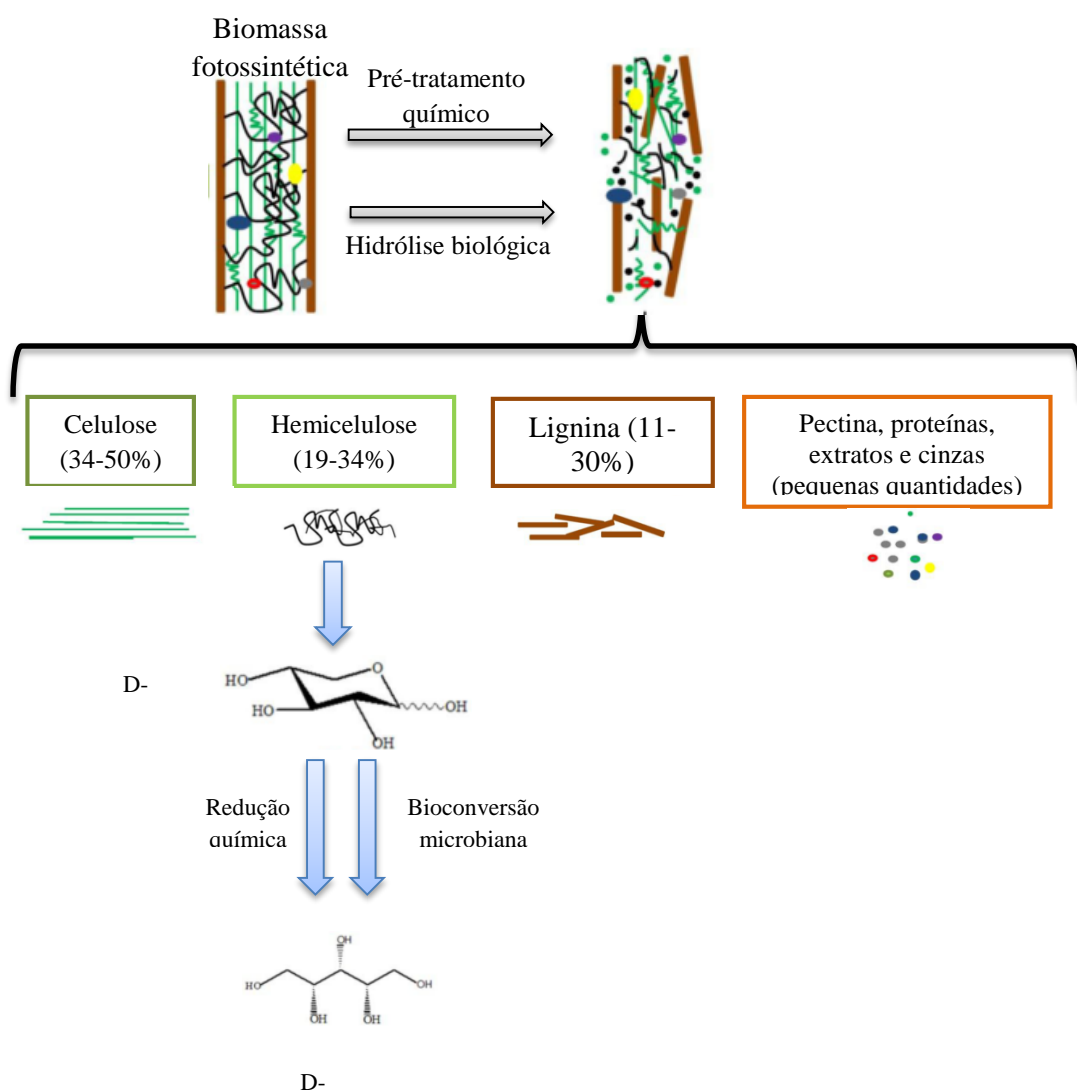
Materiais vegetais são fontes de matéria-prima potenciais para produção de energia e produtos de alto valor agregado, sendo cerca de 180 bilhões de toneladas produzidas anualmente (dos quais 40% são celulose e 30% hemicelulose) (MÄKI-ARVELA *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2011). Apenas uma pequena quantidade de celulose, hemicelulose e lignina, produzida como subproduto na agricultura é utilizada, sendo o restante considerado resíduo (BRANCO, SANTOS e SILVA, 2011).

O Brasil destaca-se por ser um país de intensa atividade agrícola, onde grande quantidade de resíduos dessa atividade é gerada anualmente. Diversos são os tipos de resíduos agrícolas e industriais produzidos, como casca, cavaco, costaneira, pó de serra, maravalha (resíduos de madeiras); bagaços de laranja, caju, abacaxi, cana de

açúcar (resíduos de indústrias de sucos e aguardentes) e palha e sabugo (provenientes do processamento de arroz, café, milho e trigo).

O Brasil possui potencial para assumir a liderança no aproveitamento integral das biomassas pelo fato de apresentar grande potencial de cultivo de matérias-primas renováveis, dispondo de vantagens comparativas e competitivas tais como: culturas agrícolas de grande extensão; maior biodiversidade do planeta; intensa radiação solar; água em abundância; diversidade de clima (CGEE, 2010).

**Figura 1.6:** Produção de xilitol a partir de biomassa lignocelulósica.



**Fonte:** Adaptado de Chen *et al.*, 2010

Xilose, glicose e arabinose são os principais açúcares obtidos a partir da biomassa lignocelulósica por hidrólise ácida, bem como manose, galactose, arabinose e ramnose (todos com diversas aplicações no âmbito farmacêutico e da indústria de alimentos) (MÄKI-ARVELA, 2011). A xilose é o segundo mais abundante açúcar encontrado na natureza, sendo que o processo da conversão de xilose em xilitol tem um papel muito importante economicamente no que diz respeito ao aproveitamento da biomassa (PRAKASH *et al.*, 2011). Dessa forma, é interessante o desenvolvimento e otimização de métodos tanto para a obtenção de xilose dos resíduos lignocelulósicos, quanto a conversão desse açúcar em produtos com valor agregado.

O bagaço do caju (BC), resíduo hemicelulósico excedente principalmente na região nordeste brasileira, é um material com potencial para ser utilizado como matéria-prima para produção de produtos com maior valor agregado e será abordado no próximo tópico.

## 4.2 Utilização do bagaço de caju

### 4.2.1 Caju

O cajueiro, que possui nome científico *Anacardium occidentale* L., pertencente à família *Anacardiaceae*, é uma árvore de troncos tortuosos originária do norte e nordeste brasileiro (ROCHA, 2010), mas que atualmente é produzido em diversos outros países com sucesso.

O pedúnculo ou pseudofruto (Figura 1.7) apresenta a maior percentagem de industrialização, estimando-se que o aproveitamento seja em torno de 12%, sendo o setor de processamento de suco integral o mais representativo no aproveitamento industrial dessa matéria-prima (PAIVA *et al.*, 2000).

**Figura 1.7:** Caju e seus componentes (Pedúnculo e castanha).



O Brasil é um dos maiores produtores de caju do mundo, estando atrás apenas de Vietnã, Nigéria e Índia. Em 2011, a área aproximada para produção de castanha de caju, principal subproduto do fruto para exportação, foi de 756 000 hectares, sendo a região Nordeste a maior responsável pela produção nacional. Os estados com maior participação nessa produção são: Ceará (55,5%), Piauí (22,1%), Rio Grande do Norte (15,6%), Maranhão (2,3%), Pernambuco (1,9%), Bahia (1,9%) e Paraíba (0,8%) (IBGE, 2011).

O bagaço do caju, que é um subproduto da extração do suco do pseudofruto, representa aproximadamente 20% do peso total do pedúnculo, sendo uma das maiores fontes de resíduos da indústria agrônômica do setor (SANTOS *et al.*, 2007). A utilização desse subproduto tem sido restrito a complementação nutricional para ração animal (RODRIGUES *et al.*, 2011), existindo, portanto a necessidade da realização de pesquisas que possam ampliar esse uso para a produção de produtos de valor agregado, como etanol ou xilitol (ROCHA *et al.*, 2011).

O bagaço de caju tem como constituinte majoritário celulose, hemicelulose e lignina, tendo sido relatado por Rocha (2010) e por Correia *et al.* (2013) as seguintes proporções desses constituintes no bagaço: 20,54% e 20,56%; 16,33% e 10,17%; 33,62% e 35,26%, respectivamente. A fração hemicelulósica do material lignocelulósico, que é composto de xilanas, é geralmente hidrolisado por ácidos, por auto hidrólise ou por enzimas produzindo, dentre diversos compostos, xilose ou xilooligosacarídeos. Esse fracionamento do material hemicelulósico é o primeiro passo para que a xilose possa estar disponível para sua aplicação biotecnológica, como a conversão microbiana, após pré-tratamento, dessa pentose em xilitol.

#### 4.2.2 Conversão do bagaço de caju em açúcares fermentescíveis

A utilização do bagaço de caju para a bioprodução de substâncias com valor agregado está subordinada a hidrólise do mesmo, uma vez que, somente assim, os açúcares presentes, como glicose e xilose, poderão ser disponibilizados para, em seguida, serem convertidos por micro-organismos específicos por fermentação. Por sua vez, o sucesso dessa hidrólise dependerá de um pré-tratamento adequado e eficaz.

Grande número de estudos tem sido realizado visando o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para produção de energia, mais especificamente de etanol (JUNG *et al.*, 2011; ALMARSDOTTIR; SIGURBJORNS; ORLYGSSON, 2012; MARVIN *et al.*, 2012). Por outro lado, essa biomassa possui um grande potencial para ser utilizada na produção de outros produtos com alto valor agregado, como o caso de xilitol (KAMAT *et al.*; MISRA, SHAIENDRA e SAXENA; PING *et al.*; 2013), necessitando-se do avanço das pesquisas científicas nesse campo.

Existe um número de características importantes para que ocorra um pré-tratamento eficaz da biomassa lignocelulósica, o qual deve ser, além de tudo, eficaz e barato. A recalcitrância da biomassa para bioprocessamento está diretamente relacionada com propriedades inerentes à fonte dessa biomassa, como conteúdo de lignina, acessibilidade da celulose por celulase e cristalinidade da celulose (AGBOR *et al.*, 2011). Para utilização da biomassa vegetal, portanto, é necessário aumentar sua reatividade, recorrendo a métodos eficazes de processamento que permitam o desarranjo das estruturas altamente ordenadas cristalinas da celulose. A maioria dos métodos de pré-tratamento destrói as paredes celulares expondo os polímeros de açúcar. Várias técnicas têm sido avaliados e otimizadas no decorrer dos últimos anos e, geralmente dividem-se em tratamentos físicos, químicos, biológicos ou a combinação desses métodos. A Tabela 1.5 apresenta a classificação dos pré-tratamentos segundo efeito sobre a matéria-prima.

**Tabela 1.5:** Classificação dos pré-tratamentos segundo efeito sobre a matéria-prima.

<b>Categoria</b>	<b>Exemplos</b>
Físicos	Moagem, redução de tamanho, micro-ondas
Químicos	Ácidos, álcalis, solventes orgânicos, peróxidos e ozônio
Físico-químicos	Explosão a vapor, AFEX* e explosão com CO <sub>2</sub>
Biológicos	Decomposição microbiana de lignina

\*AFEX: Explosão de fibra com amônia (*Ammonia Fiber Explosion*). Adaptado de Rocha, 2010.

Existes diferentes pré-tratamentos que visam a posterior hidrólise da biomassa lignocelulósica e, com isso, pode-se obter xilose para a produção fermentativa de xilitol.

Os métodos físicos, em geral, aumentam a área superficial e reduzem o grau de polimerização e cristalinidade da celulose. A energia requerida para a fragmentação mecânica da biomassa depende tanto das características da mesma quanto do tamanho da partícula requerida (AGBOR *et al.*, 2011), porém é um método muito caro comparado aos demais métodos para ser utilizado em bioprocessos (GALBE e ZACCHI, 2007). A pulverização mecânica da biomassa por moagem se mostra um método eficiente, já que produz partículas finas com celulose de cristalinidade reduzida, melhorando o processo de digestibilidade enzimática (SILVA *et al.*, 2010). Outro método físico de pré-tratamento é a utilização de micro-ondas, que atua como uma forma não convencional de aquecimento, no qual os materiais que contenham dielétricos são aquecidos por conversão da irradiação através de interações moleculares em campos eletromagnéticos (CHEN, YE e SHEEN, 2011).

Existe uma classificação grosseira de pré-tratamentos baseada no pH, que se divide em ácida, básica ou neutra, sendo essa classificação focada apenas em tratamentos químicos (AGBOR *et al.*, 2011). Alguns produtos químicos, como ácidos (FANG, DENG e ZHANG, 2011), álcalis (XU e CHENG, 2011), solventes orgânicos e líquidos iônicos (MORA-PALE *et al.*, 2011) têm sido citados por terem efeito significativo na biomassa lignocelulósica.

Diversos pré-tratamentos ácidos são relatados na literatura (CAI *et al.*, 2011; CANILHA *et al.*, 2011; FANG, DENG e ZHANG, 2011) como sendo eficientes formas de hidrolisar e reduzir a cristalinidade da celulose, abrandar a estrutura da lignina e aumentar a área superficial e volume dos poros do substrato lignocelulósico. Pré-tratamentos químicos com ácido sulfúrico e outros ácidos têm sido tradicionalmente utilizados para hidrolisar biomassa lignocelulósica, tendo, porém algumas desvantagens, como produção de inibidores e corrosão de equipamentos.

Frente à utilização de ácidos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos, a utilização de álcali também tem sido bastante difundida em diversos estudos (SILLS e GOSSETT, 2012 a,b; BANERJEE *et al.*, 2011). Nesses tratamentos, realizados a baixas temperaturas e pressões, aplicam-se soluções alcalinas para remover a lignina e substituir ácidos urônicos na hemicelulose, facilitando a acessibilidade enzimática. Potássio de sódio, hidróxido de cálcio e amônio são substâncias químicas eficazes para o processo, sendo NaOH o mais extensivamente utilizado (KUMAR *et al.*, 2009a). O tratamento da biomassa lignocelulósica com NaOH causa dilatação, levando ao aumento da área superficial interna, diminuindo a cristalinidade e separando as estruturas ligadas entre ligninas e carboidratos.

Dentre os pré-tratamentos físico-químicos pode-se citar: explosão a vapor, explosão de fibra com amônia (*Ammonia Fiber Explosion-AFEX*) e explosão de CO<sub>2</sub>. Nesse primeiro método, a biomassa é tratada com vapor saturado a altas pressões e, após isso a pressão é subitamente reduzida, o que faz com o que a biomassa sofra uma explosiva descompressão. As temperaturas e pressões de operação variam de 160-260 °C e 0,69 e 4,83 MPa, respectivamente. Esse processo causa degradação da celulose e transformação da lignina devido às altas temperaturas. Alguns autores citam a utilização de explosão a vapor como um método eficiente no pré-tratamento de resíduos (SASSNER *et al.*, 2008; ADAPA *et al.*, 2010; BISWAS *et al.*, 2011; ASADA *et al.*, 2012). AFEX é uma pré-tratamento físico-químico no qual a biomassa lignocelulósica é exposta a amônia líquida a altas temperaturas e pressões por um período de tempo e, então, a pressão é reduzida rapidamente, sendo um processo muito similar a explosão a vapor. Na literatura existem diversos trabalhos que reportam o pré-tratamento de resíduos por esse método: palha de milho (GARLOCK *et al.*; SHAO *et al.*, 2011), gramínea (GARLOCK, BALAN e DALE, 2012) e bagaço de cana-de-açúcar

(KRISHNAN *et al.*, 2010). Na explosão supercrítica com CO<sub>2</sub> as temperaturas de operação são inferiores aquelas utilizadas na explosão a vapor e as despesas reduzidas em relação à explosão com amônia. Fluido supercrítico refere-se a um fluido que está numa forma gasosa, mas é comprimido a temperaturas acima de seu ponto crítico para uma densidade líquida. Devido ao CO<sub>2</sub> liberar ácido carbônico em água aumenta-se a hidrólise do resíduo. Esse método de pré-tratamento também tem sido realizado em muitos estudos objetivando pré-tratar resíduos lignocelulósicos (LUTERBACHER, TESTER e WALKER, 2010; NARAYANASWAMY *et al.*, 2011).

Pré-tratamentos baseados na ação microbiológica, principalmente de fungos, os quais são capazes de produzir enzimas com eficiência para degradar lignina, hemicelulose e polifenóis, têm se mostrado relevantes. Esses métodos podem ser uma via alternativa economicamente viável para a degradação da lignocelulose. Esse tipo de pré-tratamento requer menos energia se comparado a outros métodos (KESHWANI e CHENG, 2009), contudo, a sua taxa operacional é muito lenta para fins industriais, dificultando sua utilização. Em geral, o tempo de residência de 10-14 dias, o cuidado com as condições de cultivo e a grande quantidade de espaço requerido para a realização desse pré-tratamento, inviabilizam seu escalonamento industrial (AGBOR *et al.*, 2011).

A utilização de métodos em conjunto também tem sido reportada como uma maneira promissora de pré-tratamento de material lignocelulósico, e já se verificou a potencialidade da utilização de um tratamento químico, térmico e enzimático para conversão de cascos de cevada em açúcares fermentescíveis (KIM *et al.*, 2011b).

#### *4.2.2.1 Pré-tratamento com hidrólise ácida*

A hidrólise com ácido diluído é uma das mais estudadas por ser eficaz e barata (RAFIQUL e SAKINAH, 2012). Em diversos trabalhos recentes tem se demonstrado que pré-hidrólise com ácido diluído pode alcançar altas taxas reacionais em curto espaço de tempo e melhorar significativamente a hidrólise da celulose, no entanto, as condições operacionais de pré-tratamento devem ser adaptadas a composição estrutural e química das diversas fontes de biomassa disponíveis (LÓPEZ-ARENAS *et*



*al.*, 2010). Esse tratamento da lignocelulose com ácidos é realizado com o objetivo de solubilizar a hemicelulose tornando a celulose mais acessível e pode ser feito com ácidos concentrados e diluídos, sendo esse último mais abordado em pesquisas científicas (CAI *et al.*; CHEN, YE E SHEEN, 2011).

Diversos estudos têm utilizado ácido sulfúrico em pré-tratamentos de resíduos lignocelulósicos para liberação de açúcares fermentescíveis, como glicose e xilose, para posterior produção de produtos com valor agregado (CANILHA *et al.*, 2011; FANG, DENG e ZHANG, 2011; KIM *et al.*, 2011a,b; ROCHA *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2011). Mas apesar desse emprego tão difundido de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, outros ácidos, como ácido peracético (YIN *et al.*, 2011) e ácido fosfórico (GEDDES *et al.*, 2010) também têm sido relatados na literatura.

Lee e Jeffries (2011), por exemplo, estudaram a eficiência de ácidos orgânicos dicarboxílicos (ácido maléico e oxálico) em comparação ao ácido sulfúrico no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. Esses autores observaram que as concentrações de xilose e glicose nos hidrolisados foram mais elevadas nos pré-tratamentos com a utilização de ácido maléico, seguido por ácido oxálico e ácido sulfúrico. Isso expressa um bom potencial de uso biotecnológico desses ácidos, uma vez que, segundo os autores, os mesmos produzem menos compostos tóxicos durante a hidrólise se comparados a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Cai *et al.* (2011) utilizaram a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para otimizar as condições de pré-tratamento de sabugo de milho para recuperação da xilose com ácido sulfúrico diluído. As condições analisadas do pré-tratamento foram as seguintes: concentração de ácido (0,16-1,84%), tempo de tratamento (0,16-1,84h) e temperatura (105-130 °C). Concluiu-se nesse estudo que as condições otimizadas para a liberação de xilose a partir da biomassa utilizada foram: 1% de ácido sulfúrico por 1,5h a 123 °C, correspondendo a 87,2% de xilana convertida em xilose.

Chen, Ye e Sheen (2011) investigaram as características da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar por solução de ácido sulfúrico diluído sob radiação de micro-ondas (180 °C por 30 min). Os resultados experimentais indicaram que 80-98% da hemicelulose do bagaço foi hidrolisada. Os rendimentos máximos de xilose e glicose,

bem como a seletividade furfural mínima ocorre na concentração de ácido de 0,005M, consequentemente, a concentração mais indicada para realização do pré-tratamento.

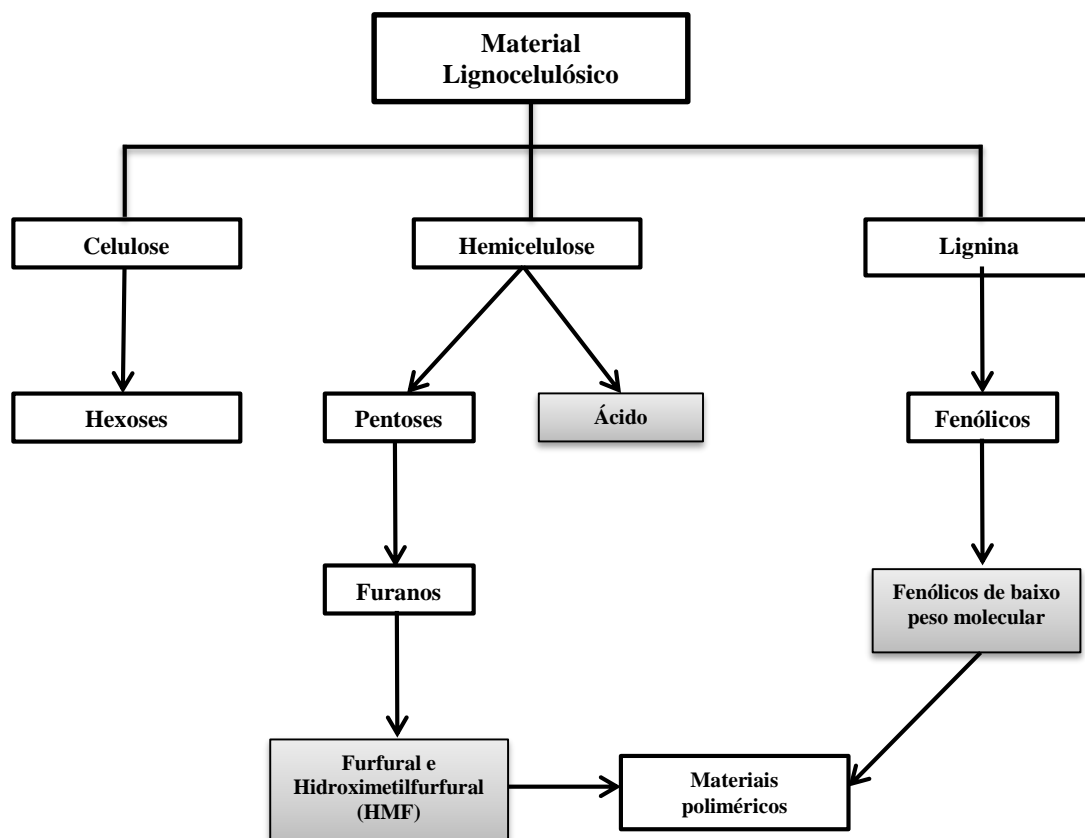
#### 4.2.3 Inibidores da fermentação em hidrolisados hemicelulósicos

Um aspecto a ser considerado na produção biotecnológica de xilitol é a formação de compostos tóxicos durante a hidrólise ácida realizada no material lignocelulósico (MUSSATTO, SANTOS e ROBERTO, 2004). Os compostos 5-hidroximetilfurfural e furfural podem ser formados durante a hidrólise, bem como compostos aromáticos, fenólicos e aldeídicos (a partir da lignina), os quais podem inibir o metabolismo microbiano (ALVES *et al.*, 1998). Durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos uma ampla variedade de compostos, os quais podem inibir os micro-organismos, podem se formar. Os inibidores presentes ou formados a partir dos hidrolisados podem limitar o consumo da fonte de carbono podendo, até mesmo impedir o processo fermentativo. Esses inibidores como, furfural, hidroximetilfurfural, ácidos alifáticos, compostos fenólicos, vanilina, podem ser produzidos durante o processo de hidrólise do material lignocelulósico, ou seja, no momento do pré-tratamento para obtenção do açúcar que será fermentado pelo micro-organismo, como a xilose (Figura 1.8). Esses compostos afetam a fisiologia desses micro-organismos e frequentemente resultam no decréscimo da sua viabilidade, menor rendimento metabólico e diminuição da produtividade (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000). Os biocatalisadores microbianos podem ser capazes de degradar alguns dos inibidores, mas a toxicidade do hidrolisado permanece, o que é determinado pela agregação de compostos ao invés de inibidores específicos (ZALDIVAR, NIELSEN e OLSSON, 1999).

Os furfurais são gerados durante a degradação da xilose a altas temperaturas e pressões. Os compostos fenólicos, inibidores formados a partir da quebra da lignina, podem existir em três diferentes formas: ácido (ácido vanílico, ácido vanílico, ácido siringico), cetona e aldeído (siringaldeído). Dentre outros inibidores derivados dos fenólicos, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido ferúlico e guaiacol são os mais comumente observados em hidrolisados ácidos. A matéria-prima lignocelulósica também pode gerar ácido tânico, terpenos e outros polímeros sob a degradação química. Além disso, os

recipientes utilizados na hidrólise podem gerar íons de metais pesados, que podem inibir reações de fermentação (MUSSATTO e ROBERTO, 2004).

**Figura 1.8:** Principais produtos que são formados durante a hidrólise de material lignocelulósico.



**Fonte:** Adaptado de Demirbas (2008)

Metodologias que envolvem hidrólise a altas temperaturas e em meio ácido conduzem a formação e liberação de uma ampla faixa de compostos. Algumas pesquisas têm se voltado a investigar a formação desses compostos quando se procede a hidrólise do material lignocelulósico para realização de fermentações biotecnológicas. A Tabela 1.6 mostra concentrações de inibidores presentes em diferentes hidrolisados lignocelulósicos.

**Tabela 1.6:** Concentrações dos principais inibidores que interferem na fermentação microbiana presentes em hidrolisados lignocelulósicos.

Hidrolisado	Tipo de tratamento	Principais inibidores (g.L <sup>-1</sup> )			Referências
		Ácido acético	HMF	Furfural	
Palha de Arroz	Ácido diluído	1,27	0,12	0,32	Huang <i>et al.</i> , 2011
Palha de Arroz	Ácido diluído	1,64	0,26	0,45	Huang <i>et al.</i> , 2011
Bagaço de caju	Ácido diluído	0,34	0,10	0,12	Rocha <i>et al.</i> , 2011
Palha de arroz	Ácido diluído	3,3	0,72	2,8	Yu, Yano e Inoue, 2010
Sabugo de milho	Ácido diluído	1,82	0,18	0,11	Li <i>et al.</i> , 2012
Palha de arroz	Ácido diluído	0,65	0	0,5	Kim <i>et al.</i> , 2011a

O furfural (2-furaldeído) e o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) são derivados furanos tóxicos formados a partir do pré-tratamento ácido de hidrolisados lignocelulósicos que podem ocasionar efeitos negativos, ainda não bem compreendidos, nas taxas de crescimento celular dos micro-organismos (KOOPMAN *et al.*, 2010; ZOU *et al.*, 2010).

O furfural é um importante inibidor do processo de fermentação na produção biotecnológica de produtos com valor agregado a partir de materiais lignocelulósicos, sendo uma substância chave no processo de inibição do crescimento microbiano (LI *et al.*, 2010). Peng *et al.* (2007) observaram que concentrações de furfural acima de 1 mg.mL<sup>-1</sup> já seriam suficientes para inibir o crescimento de uma cepa de *Saccharomyces kluyveri* no processo de produção de bioetanol. Já Zou e seus colaboradores (2010) estudaram a produção de xilitol a partir de xilose utilizando uma

cepa de *Pichia guilliermondii* sob condições limitadas de oxigênio. Esses pesquisadores concluíram que a levedura avaliada alcançou produção de 11,8 g.L<sup>-1</sup> de xilitol em meio contendo 1 g.L<sup>-1</sup> de furfural, 1 g.L<sup>-1</sup> de HMF e 1,5 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético, já quando as concentrações dos interferentes foram mais elevadas, observou-se redução na produção de xilitol.

Huang e seus colaboradores (2011) verificaram que a presença de furfural exerceu efeito negativo na produção de xilitol por uma cepa de *Candida tropicalis* JH030. A adição de 1 e 2 g.L<sup>-1</sup> de furfural causou a taxa de redução do consumo de xilose em 67,4% e 66,2%, respectivamente, comparado com o meio que não recebeu a adição de furfural; além disso, a taxa de redução na produção de xilitol reduziu em 66,8% e 67,7%, respectivamente.

Além dos furanos e compostos fenólicos, outros inibidores presentes em hidrolisados ácidos são ácido acético e extrativos das matérias-primas, tais como ácido tânico e terpeno. Contudo, eles são menos grave, em comparação com os furanos e compostos fenólicos. Em geral, o ácido acético, a um pH baixo é lipossolúvel e difunde-se através da membrana plasmática, então funcionalmente dissocia a pH neutro no interior da célula e acumula-se no citoplasma. Os prótons descarregados nesse processo diminuem o pH da célula, causando a inibição da atividade celular e morte celular (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998). Salienta-se que a toxicidade do ácido acético também depende das condições de cultivo durante o processo fermentativo.

Em adição aos inibidores citados, íons de metais pesados (ferro, cromo, níquel e cobre) têm sido observados na hidrólise de lignocelulósicos. Esses íons são gerados da corrosão dos equipamentos metálicos. Como a biomassa lignocelulósica é propensa a adsorver metais pesados, os metais terão ação afetando as enzimas envolvidas nas vias metabólicas dos micro-organismos (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000). Individualmente, ressalta-se que os inibidores podem não ter um forte efeito na fermentação dos micro-organismos, porém, quando combinados podem dificultar drasticamente as reações de fermentação.

#### 4.2.4 Tratamentos para remoção dos inibidores

Meios de cultura formulados a partir de hidrolisados hemicelulósicos utilizados para bioconversão de D-xilose são fortemente afetados pela presença de compostos formados durante a hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica (MORITA e SILVA, 2000). Devido às altas temperaturas e condições ácidas empregadas, furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), ácidos alifáticos e compostos fenólicos são produzidos os quais afetam o crescimento celular reduzindo a atividade enzimática e funções celulares microbianas (FONSECA *et al.*, 2011).

Diversos métodos de destoxificação são utilizados para remoção de compostos tóxicos de hidrolisados de biomassa vegetal, como tratamento biológico por enzima (lacase), tratamento físico, evaporação e extração, tratamento químico com agentes alcalinizantes (NaOH, CaO, Ca(OH)<sub>2</sub>) e tratamento físico-químico por adsorção com carvão ativado e resinas de troca iônica (SILVA, 2011).

Os tratamentos que empregam micro-organismos para destoxificação do hidrolisado lignocelulósico vêm recebendo bastante atenção nos últimos anos. Abordagens biotecnológicas para destoxificação abrangem a aplicação de micro-organismos ou enzimas celulares nos hidrolisados. Os métodos biológicos de destoxificação são demandados devido à sua simplicidade, condições de trabalho mais leves, que evitem uma maior utilização de produtos químicos, menor frequência de reações colaterais e menor energia requerida. No entanto, as suas limitações incluem tempo de reação lenta, a especificidade de inibidor, e a perda de açúcares fermentáveis (TIAN *et al.*, 2009). Fonseca *et al.* (2011) estudaram a destoxificação biológica de diferentes hidrolisados hemicelulósicos (fibra de milho, palha e bagaço de cana de açúcar, cascas de grãos de café) utilizando a levedura *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097. Os valores mais altos quando a redução de inibidores e menor perda de açúcares foram observados quando o hidrolisado foi concentrado cinco vezes antes do tratamento biológico. As reduções totais observadas em 24 h de experimento foram de: siringaldeído (66,67%), ácido ferúlico (73,33%), furfural (62%) e 5-HMF (82%).

A destoxificação enzimática também é uma rota biotecnológica promissora para destoxificar hidrolisado lignocelulósico. O mecanismo de destoxificação envolve o

uso de enzimas de polimerização oxidativa de compostos fenólicos de baixo peso molecular. Lacases e peroxidases derivadas de fungos da podridão branca (*Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Cyathus bulleri*, *Cyathus stercoreus* e de *Pycnoporous cinnabarinus*) foram consideradas eficazes para a remoção de compostos fenólicos de hidrolisados lignocelulósicos (CHANDEL, SILVA e SINGH, 2012).

As resinas de troca iônica são empregadas na redução de interferentes microbianos dos hidrolisados lignocelulósicos (CANILHA, ALMEIDA e SOLEZAL, 2004; DING e XIA, 2006). A utilização de carvão ativado para reduzir os interferentes da fermentação é mencionada em diversos trabalhos (TADA, KANNO e HORIUCHI 2012; MISRA, RAGHUWANSHI e SAXENA, 2013; MUSHTAQ *et al.*, 2013). Esse tipo de tratamento é um método eficiente e econômico para a redução de compostos fenólicos, ácido acético, compostos aromáticos, furfural e 5-HMF (encontrados nos hidrolisados (CANILHA *et al.*, 2008).

## 5 PURIFICAÇÃO DO XILITOL

Nos últimos anos a cristalização do xilitol tem chamado atenção dos cientistas. A recuperação e purificação são etapas complicadas em muitos processos fermentativos, uma vez que, geralmente, depende da natureza do produto bem como da composição complexa do caldo fermentativo (FAVERI *et al.*, 2004). Xilitol, sorbitol e arabinitol são difíceis de serem separados em escala industrial e uma técnica de separação específica seria de grande valor. Pouca informação está disponível sobre a recuperação de xilitol, estando os relatos mais direcionados para o tratamento do hidrolisado hemicelulósico, fermentação e bioconversão metabólica (MISRA *et al.*, 2011).

A literatura mostra estudos escassos para recuperação do xilitol a partir de caldos fermentados e o estabelecimento de uma metodologia que permita uma recuperação e que torna sua produção biotecnológica viável é desejado (MUSSATTO *et al.*, 2006).

A purificação de soluções por extração líquido-líquido e precipitação é usada em numerosos processos industriais com o objetivo de recuperar substâncias dissolvidas ou para remover impurezas indesejáveis. Por outro lado, a estratégia mais eficiente usada para purificação do xilitol é o tratamento com carbono ativo seguido por concentração a vácuo e métodos de cristalização (RIVAS *et al.*; SAMPAIO *et al.*, 2006). Diversos métodos podem ser utilizados em conjunto para otimização do processo de purificação do xilitol bem como o alcance de rendimentos mais elevados. Alguns estão tratados a seguir.

### 5.1 Cristalização e precipitação

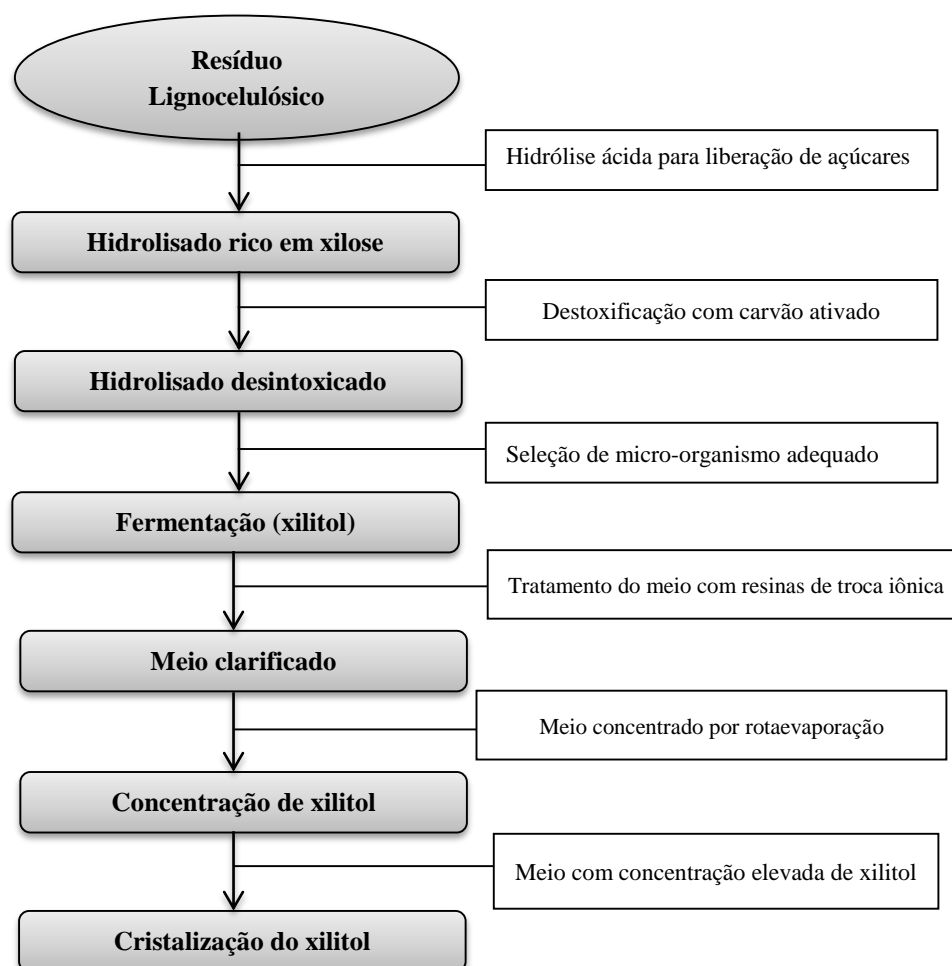
Muitos estudos têm se voltado para a obtenção de xilitol pelo processo de purificação seguido, então, por um processo de cristalização. A prevalência da cristalização como método de purificação é devido à obtenção de cristais com alta



pureza e tamanho uniforme, o que facilita as etapas seguintes do processo, tais como filtração, lavagem e secagem do produto. Para melhorar a pureza e rendimento dos cristais de xilitol, alguns estudos têm focado no processo de purificação por resinas de troca iônica e otimização das condições de cristalização.

Wei *et al.* (2010), por exemplo, testaram quatro tipos de combinações entre diferentes resinas de troca aniônica e catiônica com o objetivo de remover os inibidores do caldo de fermentação, principalmente sais. Os mesmos autores seguiram o processo até a cristalização e precipitação do xilitol. A Figura 1.9 representa um diagrama geral do processo de escala de bancada para bioprodução de xilitol, no qual a etapa final é a cristalização do produto.

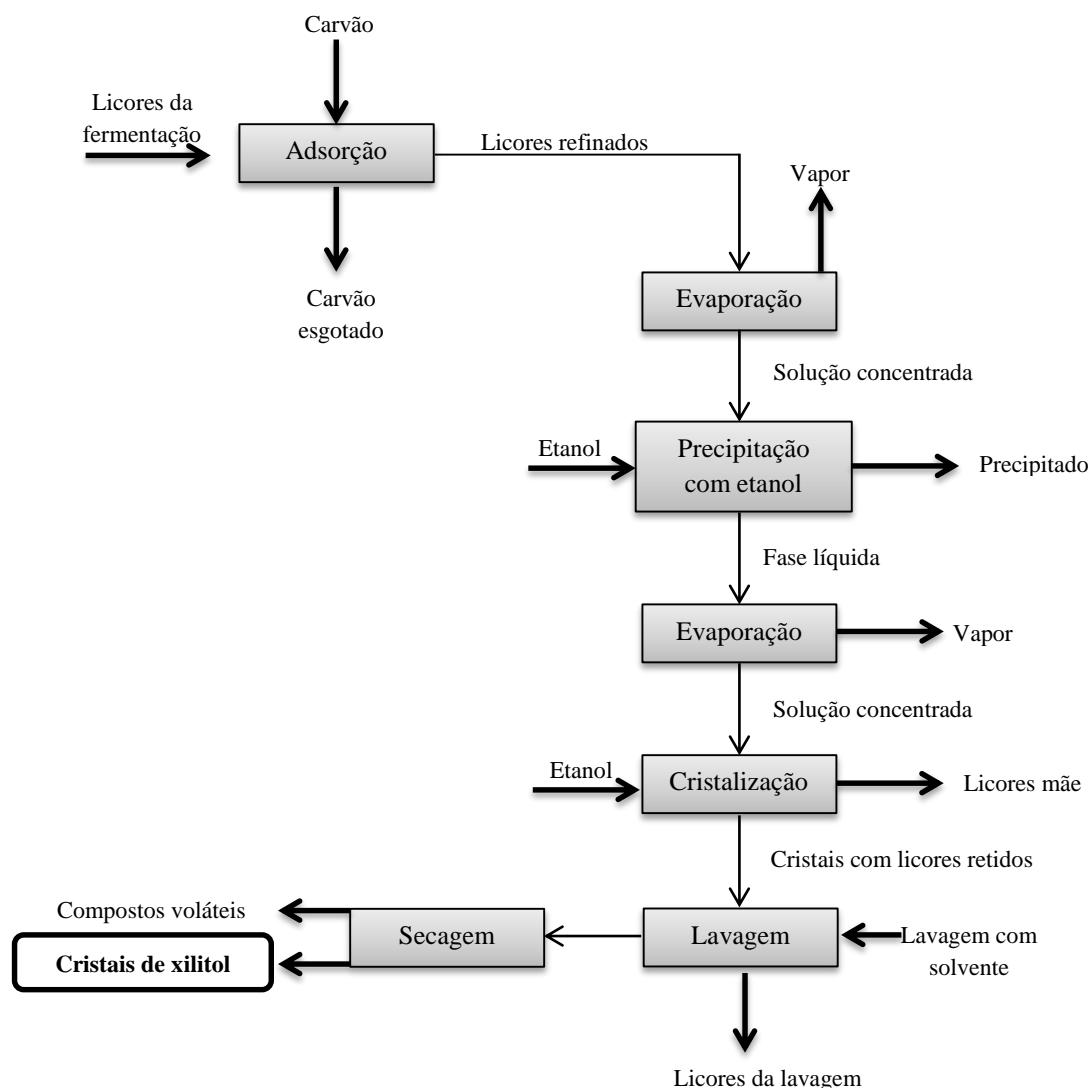
**Figura 1.9:** Diagrama de processo geral de escala de bancada para bioprodução de xilitol a partir de material lignocelulósico.



A cristalização e a precipitação são responsáveis por 70% de todos os materiais sólidos produzidos pela indústria química, sendo processos importantes, visto o baixo consumo de energia e alta produtividade de produtos puros. A purificação do xilitol a partir do caldo fermentado é dificultada devido à baixa concentração do produto e da complexa composição do meio (GURGEL *et al.*, 1995).

Antes do processo de cristalização um processo de tratamento e concentração do caldo fermentado deve ser realizado para otimizar o processo. Martínez *et al.* (2007), por exemplo, realizaram um procedimento no qual centrifugaram o meio fermentado e o filtraram após a adição de NaOH 3N até pH 7,0. O licor rico em xilitol foi então tratado com resinas catiônicas (C-504) e aniônicas (A-505) e submetido à concentração. Rivas *et al.* (2006) purificaram xilitol obtido por fermentação de hidrolisado de sabugo de milho seguindo um extenso processo que está apresentado de forma simplificada na Figura 1.10. Destaca-se de forma simplificada nesse processo etapas que visaram inicialmente a concentração do caldo fermentado para aumento da concentração de xilitol. Após isso, o meio foi submetido a precipitação com o uso de etanol como solvente para obter os cristais.

**Figura 1.10:** Esquema do processo considerado para purificação de xilitol a partir de meio composto por hidrolisado hemicelulósico.



**Fonte:** Adaptado de Rivas *et al.* (2006)

### 5.1.1 Métodos preliminares de purificação visando a obtenção de xilitol

Segundo Santos (2004), a adsorção, em operações em batelada ou colunas (cromatografia), é um dos métodos utilizados em processos de separação de açúcares e polióis. Este fenômeno ocorre quando um soluto dissolvido (adsorbato) se liga a um adsorvente sólido através de forças intermoleculares relativamente fracas (adsorção física) ou de ligações químicas (adsorção química). A análise da adsorção é baseada no equilíbrio, então apresentado sob a forma de isotermas de adsorção. Estas isotermas relacionam a concentração do soluto na solução e na superfície do adsorvente.

A composição complexa de meios a base de hidrolisado requer etapas prévias de purificação antes de o produto ser cristalizado, sendo diversas as formas utilizadas nessas etapas antecedentes. Misra e colaboradores (2011) realizaram um pré-tratamento com carvão ativado e concentração antes do processo de cristalização de xilitol a partir de meio fermentado a base de sabugo de milho hidrolisado. O tratamento foi otimizado testando-se diferentes concentrações de carvão (5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 g.L<sup>-1</sup>) a temperatura de 30,0 °C, sendo o rendimento ótimo da cristalização de xilitol alcançado na concentração de 15,0 g.L<sup>-1</sup>.

Os efeitos de carvão ativado para a relação de massa do licor na etapa de adsorção foram avaliados em experimentos selecionados, assim como os efeitos das variáveis mais influentes na cristalização (proporção de etanol no meio e temperatura) sobre as quantidades e propriedades das fases resultantes (RIVAS *et al.*, 2006).

Mussatto *et al.* (2006) estudaram a recuperação do xilitol por adsorção em batelada e cristalização de fermentado de bagaço de cana hidrolisado. A adsorção com sílica gel foi empregada para purificar o caldo contendo xilitol. Nessa etapa, diferentes misturas de solventes de acetato de etila, etanol e acetona foram usadas como eluentes, e diferentes proporções de volume do caldo fermentado incorporados por grama de sílica gel para empacotar a coluna utilizada como leito da fase estacionária (Tabela 1.7).

**Tabela 1.7:** Condições experimentais usadas em cada coluna para fracionamento de fermentado de hidrolisado de bagaço de cana por Mussatto et al. (2006).

Coluna	Sílica gel (g)	Volume do caldo fermentado (cm <sup>3</sup> )	V <sub>F</sub> /M <sub>sg</sub> *
1	50	50	1,0
2	50	50	1,0
3	30	50	1,7
4	30	100	2,0

\*Volume de caldo fermentado incorporado por grama de sílica gel

Na coluna 1 não foi possível observar nenhuma purificação do xilitol. Já na coluna 2, xilitol foi eluído em 30 frações, e somente em 7 estava em mistura com arabinose. No entanto, um grande volume de eluente na coluna 2 foi utilizado ( $1400\text{ cm}^3$ ) para eluir completamente o xilitol em baixas concentrações (inferiores a  $0,3\text{ g.dm}^{-3}$ ). Na coluna 3 xilitol também foi eluído em baixas concentrações ( $<0,2\text{ g.dm}^{-3}$ ) e também necessitou de uma grande quantidade de eluente ( $1680\text{ cm}^3$ ) para ser completamente eluído. A purificação mais eficiente ocorreu na coluna 4, que usou etanol e acetato de etila como eluentes.

A separação entre açúcares residuais (xilose e arabinose) e xilitol é dificultada devido às estruturas similares que possuem essas substâncias. Xilose e arabinose podem melhorar a viscosidade do caldo fermentativo, influenciando, assim, a pureza e a forma do cristal. Wei *et al.* (2010) estabeleceram um processo de adsorção seletiva com resinas fortes de troca catiônica  $\text{Ca}^{2+}$  quelatado uma vez que é sabido que o xilitol adsorve mais fortemente que os açúcares residuais. Após o equilíbrio de adsorção, os açúcares residuais foram lavados por uma solução de dessorção e, em seguida, o xilitol.

Canilha *et al.* (2008) utilizaram resinas de troca iônica para clarificar meio fermentado a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo com objetivo de, em seguida, cristalizar xilitol. Após a remoção dos materiais em suspensão por centrifugação o meio foi clarificado com resinas de troca iônica (C-150; A-860; A-500) para minimizar o conteúdo de sólidos solúveis indesejáveis. Liavoga, Bian e Seib (2007) purificaram xilitol produzido a partir de hidrolisado de palha de milho utilizando cromatografia de troca iônica em coluna aberta. A resina utilizada no experimento foi Dowex 2 (malha 100-200). Santos (2004) estudou a recuperação do xilitol produzido por fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando zeólitas, que são aluminossilicatos cristalinos e hidratados que têm se destacado como adsorventes devido ao caráter microporoso, à dimensão de poro uniforme, à elevada área específica, à adsorção seletiva baseada nas dimensões moleculares, às propriedades de troca iônica e à estabilidade térmica. Industrialmente, trocadores aniônicos são utilizados para remoção de compostos de cores de xaropes de açúcar, enquanto trocadores catiônicos são utilizados para desmineralização e remoção de produtos orgânicos carregados positivamente a partir de fluxos de açúcar.

### 5.1.2 Cristalização

A cristalização, também utilizada em etapas finais para purificação de xilitol, é considerada uma etapa chave, determinando o rendimento e a qualidade do produto (WANG *et al.*, 2007). Na literatura, relatam-se três zonas envolvidas no processo de cristalização, em que numa concentração muito baixa de saturação não há nenhuma possibilidade de nucleação ou crescimento do cristal. Em segundo lugar, na zona metastável supersaturada, existe a ocorrência de crescimento de cristais, mas a nucleação não ocorre. Acredita-se que a nucleação primária é a primeira etapa para o processo de cristalização (Figura 1.11). Nessa etapa ocorre uma série de colisões biomoleculares que forma um agregado de pequeno número de moléculas de materiais dissolvidos (embriões). Em terceiro lugar há uma zona lábil onde os núcleos são formados espontaneamente a partir de uma solução límpida (MULLIN, 1992).

**Figura 1.11:** Fotografia de xilitol purificado e cristalino do após tratamento com carvão ativado e seguido por concentração a vácuo e pelo método de cristalização.



**Fonte:** Misra *et al.*, 2011

Para determinar os solventes apropriados e para construir um processo de produção otimizado é necessário conhecer a solubilidade do xilitol em diferentes solventes. Wang *et al.* (2007) estudaram essa solubilidade, com uma técnica a laser, em etanol, acetona, N,N-dimetilformamida (DMF), 1-butanol, 1-pentanol, tolueno, 2-

propanol e água e verificaram nos experimentos que a solubilidade é função da temperatura; que a solubilidade decresce na seguinte ordem: água > DMF > etanol > 2-propanol > 1-butanol > 1-pentanol > acetona > tolueno.

Diversas metodologias vêm sendo pesquisadas para se melhorar a eficiência da cristalização. Mussatto *et al.* (2006), após purificação do caldo fermentado em sílica gel, avaliaram 4 diferentes procedimentos para cristalização de xilitol, que estão apresentados na Tabela 1.8. Esses autores concluíram que o resfriamento do caldo fermentado e concentração favorece a cristalização do xilitol, mas a adição de xilitol comercial no caldo concentrado também é muito eficiente em promover a formação dos cristais. No entanto, altos rendimentos de cristalização só são alcançados com a solução purificada, visto que contaminantes afetam a cristalização.

**Tabela 1.8:** Métodos de cristalização utilizados por Mussatto *et al.* (2006) para recuperação de xilitol, rendimento da cristalização e do xilitol recuperado.

Métodos	Rendimento da cristalização de xilitol (%) <sup>a</sup>	Rendimento de xilitol recuperado (%) <sup>b</sup>
As frações foram mantidas separadamente a 4 °C por 24 h	15,7	15,7
As frações foram mantidas separadamente a temperatura ambiente por 12h e, em seguida, a 4 °C por 72h	67,3	17,5
As frações foram mantidas separadamente a 4 °C/24 h. Em seguida, foram combinadas e concentradas 6,5 vezes em um rotaevaporador a baixa temperatura (50 °C). Xilitol padrão (45 mg) foi adicionada na solução concentrada, a qual foi mantida a 4 °C por 24h	38,0	5,7
As frações foram combinadas, concentradas 6,5 vezes em um rotaevaporador a baixa temperatura (50 °C) e mantido a 4 °C por 24h. Após isso, xilitol padrão (400 mg) foi adicionado à solução para forçar a precipitação	60,0	33,0

<sup>a</sup> Rendimento calculado baseado na concentração total de xilitol presente nas frações onde a precipitação ocorreu.

<sup>b</sup> Rendimento calculado baseado na concentração total de xilitol presente na solução de pré-coluna.

Rivas *et al.* (2006) realizaram a cristalização para purificação de xilitol produzido a partir de hidrolisado de sabugo de milho. A cristalização foi realizada por resfriamento na presença de um solvente tanto para reduzir a solubilidade do xilitol como para melhorar a pureza dos cristais. Xilitol tem alta solubilidade em água, mas é pouco solúvel em metanol, 2-propanol e etanol, tendo se utilizado esse último como solvente na fase de precipitação. As temperaturas utilizadas foram de -5 e -10 °C e as concentrações de etanol foram de 40, 50 e 60%, concluindo-se que a melhor condição para a cristalização foi a temperatura de -5 °C com etanol a uma concentração volumétrica de 60%. A cristalização levou a formação de cristais homogêneos, bem formados e regulares contendo 98,9% em peso de xilitol. Após concentração de 10 vezes em rotavapor a  $55 \pm 5$  °C uma solução com concentração final de 637,08 g.L<sup>-1</sup> de xilitol foi selecionada para cristalização. Diferentes temperaturas para inicialização da cristalização foram testadas (-20,0 e 8,0 °C) e concluiu-se que a -20 °C a iniciação da formação dos cristais é rápida e com alto grau de pureza, já a 8 °C não só a iniciação é tardia como também os cristais formados são quebradiços e de menores dimensões.



## 6 REFERÊNCIAS

1. ADAPA, P.; TABIL, L.; SCHOENAU, G.; OPOKU, A. Pelleting characteristics of selected biomass with and without steam explosion pretreatment. **International Journal**, v. 3, n. 3, p. 62-79, 2010.
2. ADITIVOS E INGREDIENTES. OS POLÍÓIS. Disponível em: [http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/81.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/81.pdf). Acesso em: 06 de nov. 2013.
3. AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.
4. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), BRASIL. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos>. Acesso em: 29 de janeiro de 2011.
5. AHMAD, I.; SHIM, W. Y.; KIM, J.-H. Enhancement of xylitol production in glycerol kinase disrupted *Candida tropicalis* by co-expression of three genes involved in glycerol metabolic pathway. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 1279-84, 2013
6. AKINTERINWA O.; KHANKAL, R.; CIRINO, P. C. Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 461–467, 2008.
7. AKIYAMA, H; OONO, T.; HUH, W. K.; YAMASAKI, O.; OGAWA, S., KATSUYAMA, M., ICHIKAWA, H., IWATSUKIA, K. Actions of Farnesol and xylitol against *Staphylococcus aureus*. **Chemotherapy**, v. 48, p. 122-128, 2002.
8. ALMARSDOTTIR, A. R.; SIGURBJORNSDOTTIR, M. A.; ORLYGSSON, J. Effect of various factors on ethanol yields from lignocellulosic biomass by *Thermoanaerobacterium* AK17. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 3, p. 686-694, 2012.
9. ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. E. S.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p.89-98, 1998.
10. AMMONS, M. C. B.; WARD, L. S.; DOWD, S.; JAMES, G. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with lactoferrin and xylitol inhibits the ability of bacteria to respond to damage resulting from lactoferrin iron chelation. **International journal of antimicrobial agents**, v. 37, n.4, p. 316-23, 2011.

11. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DE AGROENERGIA. DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS (USDA). – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 27 de janeiro de 2012.
12. ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J.; SCHUTHOF, J.; SMITS, M. T. Influence of xylitol on demineralization of enamel. **Caries Research**, v. 18, p. 296-301, 1984.
13. ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. D. C. L. B.; SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. D. G. D. A. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, v. 22, n. 4, p. 815-22, 2011.
14. ASADA, C.; SASAKI, C.; UTO, Y.; SAKAFUJI, J.; NAKAMURA, Y. Effect of steam explosion pretreatment with ultra-high temperature and pressure on effective utilization of softwood biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 25-29, 2012.
15. ASSEV, S.; WALER, S. M.; ROLLA, G. Xylitol fermentation by human dental plaque. **European Journal Oral Science**, v. 104, p. 359-62, 1996.
16. BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J. S.; HODGE, D. B.; WALTON, J. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 16, p. 1-15, 2011.
17. BANERJEE, S.; ARCHANA, A.; SATYANARAYANA, T. Xylose metabolism in a thermophilic mould *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* TMD-8. **Current Microbiology**, v. 29, p. 349-52, 1994.
18. BÄR, A. Xylitol. In: O'BREEN NABORS, L., GELARDI, R. C. **Alternative sweeteners**. New York: Marcel Dekker, 1991, p. 349-79.
19. BERGHÄLL, S.; HILDITCH, S.; PENTTILÄ, M.; RICHARD, P. Identification in the mould *Hypocrea jecorina* of a gene encoding an NADP<sup>+</sup>: D-xylose dehydrogenase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, p. 249-253, 2007.
20. BISWAS, A. K.; UMEKI, K.; YANG, W.; BLASIAK, W. Change of pyrolysis characteristics and structure of woody biomass due to steam explosion pretreatment. **Fuel Processing Technology**, v. 92, n.10, p. 1849-1854, 2011.
21. BOND, M. Xylitol: A natural approach to caries prevention. Danisco Sweeteners Ltda. Disponível em: [http://www.naturallysweet.com.au/uploads/50072/ufiles/download\\_info/Xylitol\\_A\\_Natural\\_Approach\\_To\\_Caries\\_Prevention.pdf](http://www.naturallysweet.com.au/uploads/50072/ufiles/download_info/Xylitol_A_Natural_Approach_To_Caries_Prevention.pdf). Acesso em: 27 de janeiro de 2012.

22. BRANCO, F. R.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3241-3246, 2011.
23. BRIONES, R.; SERRANO, L.; LABIDI, J. Valorization of some lignocellulosic agro-industrial residues to obtain biopolyols. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 87, p. 244-249, 2012.
24. BURA, R.; VAJZOVIC, A. DOTY, S. L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 10, p. 1453-1463, 2012.
25. CAI, B. Y.; GE, J.-PING; LING, H. Z., CHENG, K. K., PING, W. X. Statistical optimization of dilute sulfuric acid pretreatment of corncob for xylose recovery and ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 250-257, 2011.
26. CAMPUS, G.; CAGETTI, M. G.; SALE, S.; PETRUZZI, M.; SOLINAS, G.; STROHMENGER, L.; LINGSTRÖM, P. Six months of high-dose xylitol in high-risk caries subjects--a 2-year randomised, clinical trial. **Clinical oral investigations**, v. 17, n. 3, p. 785-91, 2013.
27. CANETTIERI, E. V.; SILVA, J. B. A.; ALMEIDA, D.; FELIPE, M. G. A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 323-331, 2002.
28. CANILHA, L.; ALMEIDA, S. J. B.; SOLENZAL, A. I. N. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchanger resins for xylitol production, **Process Biochemistry**, v.39, p. 1909-1912, 2004.
29. CANILHA, L.; CARVALHO, W.; GIULIETTI, M.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A. Clarification of a wheat straw-derived medium with ion-exchange resins for xylitol crystallization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 715-72, 2008.
30. CANILHA, L.; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G. J. M.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 38, p. 1467-1475, 2011.
31. CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MEDEIROS, R., GÍRIO, F. M. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: effect of supplementation. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 12, p. 1887-1891, 2007.
32. CASTRO, J. F.; PARRA, C.; YA, M.; ROJAS, J.; TEIXEIRA, R.; BAEZA, J.; FREER, J. Optimal pretreatment of *Eucalyptus globulus* by hydrothermolysis and alkaline extraction for microbial production of ethanol and xylitol, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.52, p. 5713-5720, 2013.

33. CGEE (2010). **Química Verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos.
34. CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. **BioEnergy Research**, v. 6, p. 388-401, 2012.
35. CHEN, K. N.; CHEN, M. J.; SHIU, J. S. Development of probiotic candies with optimal viability by using response surface methodology and sequential quadratic programming. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 21, n. 6, p. 896-902, 2008.
36. CHEN, W. H.; YE, S. C.; SHEEN, H. K. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. **Applied Energy**, v. 93, p. 237-244, 2011.
37. CHEN, X.; JIANG, Z.-H.; CHEN, S.; QIN, W. Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application. **International journal of biological sciences**, v. 6, n. 7, p. 834-44, 2010.
38. CHENG, K. K.; ZHANG, J. A.; LING, H. Z.; PING, W. X.; HUANG, W.; GE, J. P.; XU, J. M. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v.43, n. 2, p. 203-207, 2009.
39. CHOI, H. S.; CHOI, Y. S.; PARK, H. C. Fast pyrolysis characteristics of lignocellulosic biomass with varying reaction conditions. **Renewable Energy**, v. 42, p. 131-135, 2012.
40. CIRINO, P. C.; CHIN, J. W.; INGRAM, L. O. Engineering *Escherichia coli* for xylitol production from glucose-xylose mixtures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 6, p. 1167-1176, 2006.
41. CORREIA, J. A. C.; JUNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. **Process Biochemistry**, v. 139, p. 249-256, 2013.
42. DANHAUER, J. L.; KELLY, A.; JOHNSON, C. E. Is mother-child transmission a possible vehicle for xylitol prophylaxis in acute otitis media? **International Journal of Audiology**, v. 50, n. 10, p. 661-672, 2011.
43. DASHTBAN, M.; KEPKA, G.; SEIBOTH, B.; QIN, W. Xylitol production by genetically engineered *Trichoderma reesei* strains using barley straw as feedstock. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, p. 554-569, 2013.
44. DEMIRBAS, A. Products from lignocellulosic materials via degradation processes. **Energy Sources**, v. 30, p.27-37, 2008.

45. DIÉGUEZ, C. G.; SALGADO, J. M.; ROCA, E.; DOMÍNGUEZ, J. M. Kinetic modelling of the sequential production of lactic acid and xylitol from vine trimming wastes. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 34, n. 7, p. 869-878, 2011.
46. DING, X. H.; XIA, L. M. Effect of aeration rate on production of xylitol from corncob hemicellulose hydrolysate, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, p. 263-270, 2006.
47. DURAIRAJ, L.; LAUNSPACH, J.; WATT, J. L.; MOHAMAD, Z.; KLINE, J.; ZABNER, J. Safety assessment of inhaled xylitol in subjects with cystic fibrosis. **Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society**, v. 6, n. 1, p. 31-4, 2007.
48. EDELSTEIN, S.; SMITH, K.; WORTHINGTON, A.; GILLIS, N.; BRUEN, D.; KANG, S. H.; GILPIN, K.; ACKERMAN, J.; GUIDUCCI, G. Comparisons of six new artificial sweetener gradation ratios with sucrose in conventional-method cupcakes resulting in best percentage substitution ratios. **Journal of Culinary Science & Technology**, v. 5, n. 4, p. 61-74, 2008.
49. EL-BAZ, A. F.; SHETAIA, Y. M.; ELKHOULI, R. R. Xylitol production by *Candida tropicalis* under different statistically optimized growth conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 68, p. 15353-15363, 2011.
50. FANG, H.; DENG, J.; ZHANG, T. Dilute acid pretreatment of black spruce using continuous steam explosion system. **Apply Biochemistry Biotechnology**, v. 163, p. 547-557, 2011.
51. FAVERI, D. D.; TORRE, P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Statistical investigation on the effects of starting xylose concentration and oxygen mass flowrate on xylitol production from rice straw hydrolyzate by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 65, p. 383-389, 2004.
52. FISKER, H. O.; NISSEN, V. Effect of gum base and bulk sweetener on release of specific compounds from fruit flavoured chewing gum, p. 429-432, 2006.
53. FONSECA, B. G.; MOUTTA, R. O.; FERRAZ, F. O.; VIEIRA, E. R.; NOGUEIRA, A. S.; BARATELLA, B. F.; RODRIGUES, L. C.; RUI, Z. H. ; SILVA, S. S. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 38, p. 199-207, 2011.
54. FRANCESCHIN, G.; SUDIRO, M.; INGRAM, T.; SMIRNOVA, I.; BRUNNER, G.; BERTUCCO, A. Conversion of rye straw into fuel and xylitol: a technical and economical assessment based on experimental data. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 6, p. 631-640, 2011.
55. GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 41-65, 2007.

56. GARCÍA, F. J.; SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V.; CUEVAS, M.; RIGAL, L.; GASET, A. Xylitol production from olive-pruning debris by sulphuric acid hydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*. **Holzforschung**, v. 65, v. 1, p. 59-65, 2011.
57. GARLOCK, R. J.; BALAN, V.; DALE, B. E. Optimization of AFEX™ pretreatment conditions and enzyme mixtures to maximize sugar release from upland and lowland switchgrass q. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 757-768, 2012.
58. GARLOCK, R. J.; BALS, B.; JASROTIA, P.; BALAN, V.; DALE, B. E. Influence of variable species composition on the saccharification of AFEX™ pretreated biomass from unmanaged fields in comparison to corn stover. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 49-59, 2011.
59. GEDDES, C. C.; PETERSON, J. J.; ROSLANDER, C.; ZACCHI, G.; MULLINNIX, M. T.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. **Bioresource technology**, v. 101, p. 1851-857, 2010.
60. GONZÁLEZ-SISO, M.; FREIRE-PICOS, M.; RAMIL, E.; GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, M.; RODRÍGUEZ, T. A.; CERDÁN, M. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Insights and perspectives. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, p. 699-705, 2000.
61. GURGEL, P. V.; MANCILHA, I. M.; PEÇANHA, R. P.; SIQUEIRA, J. F. M. Xylitol recovery from fermented sugarcane bagasse hydrolyzate. **Bioresource Technology**, v. 52, p. 219-223, 1995.
62. HONGZHI, L.; KEKE, C.; JINGPING, G.; WENXIANG, P. Statistical optimization of xylitol production from corncob hemicellulose hydrolysate by *Candida tropicalis* HDY-02. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p.673-678, 2011.
63. HUANG, C.-F.; JIANG, Y.-F.; GUO, G.-L.; WANG, W.-S. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3322-9, 2011.
64. HYVÖNEN, L., KOIVISTOINEN, P., VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. **Advances Food Research**, v.28, p.373-403, 1982.
65. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, v.24, n. 2, p.1-82 fev, 2011.
66. IMAZATO, S.; IKEBE, K.; NOKUBI, T.; EBISU, S.; WALLS, A. W. Prevalence of root caries in a selected population of older adults in Japan. **Journal Oral Rehabilitation**, v. 33, p. 137-143, 2006.

67. ISLAM, M. S. Effects of xylitol as a sugar substitute on diabetes-related parameters in nondiabetic rats. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 5, p. 505-511, 2011.
68. JAFFE, G. M.; SZKRYBALO, W.; WEINERT, P. H. Process for producing xylose. Patent US n 3.784.408, 1974.
69. JUNG, Y. H.; KIM, I. J.; KIM, J. J.; OH, K. K.; HAN, J.; CHOI, I. G. Ethanol production from oil palm trunks treated with aqueous ammonia and cellulase. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7307-7312, 2011.
70. KAMAT, S.; GAIKWAD, S.; KUMAR, A. R.; GADE, W. N. Xylitol production by *Cyberlindnera (Williopsis) saturnus*, a tropical mangrove yeast from xylose and corn cob hydrolysate. **Journal of applied microbiology**, 2013.
71. KESHWANI, D. R.; CHENG, J. J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1515-1523, 2009.
72. KIM, J.-W.; SEOB, K.; LEE, J.-SUK; MIN, S., CHO; H.-YOUNG; CHAN, J., & SEOK, J. Two-stage pretreatment of rice straw using aqueous ammonia and dilute acid. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8992-8999, 2011a.
73. KIM, T. H.; NGHIEM, N. P.; TAYLOR, F.; HICKS, K. B. Consolidated Conversion of Hulled Barley into Fermentable Sugars Using Chemical, Thermal, and Enzymatic (CTE) Treatment. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 164, p. 534-545, 2011b.
74. KO, C. H.; CHIANG, P. N.; CHIU, P. C.; LIU, C. C.; YANG, C. L.; SHIAU, I. L. Integrated xylitol production by fermentation of hardwood wastes. **Chemical Technology**, v. 83, p. 534-540, 2008.
75. KOOPMAN, F.; WIERCKX, N.; DE WINDE, J. H.; RUIJSSENAARS, H. J. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 11, p. 4919-24, 2010.
76. KRISHNAN, C.; SOUSA, L. C.; JIN, M.; CHANG, L.; DALE, B. E.; BALAN, V. Alkali-Based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 441-450, 2010.
77. KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J., STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 3713-3729, 2009a

78. KUMAR, S.; SINGH, S. P.; MISHRA, I. M.; ADHIKARI, D. K. Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IPE453. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 36, p.1483-1489, 2009b.
79. LEE, J.-W.; JEFFRIES, T. W. Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. **Bioresource technology**, v. 102, p. 5884-90, 2011.
80. LEE, S.-H., CHOI, B.-K., & KIM, Y.-J. The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. **Archives of oral biology**, v. 57, p. 6, 697-703, 2012.
81. LEVI, J. R.; BRODY, R. M.; MCKEE-COLE, K.; PRIBITKIN, E.; O'REILLY, R. Complementary and alternative medicine for pediatric otitis media. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 77, p. 926-931, 2013.
82. LI, H.; CHAI, X.; ZHAN, H.; FU, S. Rapid determination of furfural in biomass hydrolysate by full evaporation headspace gas chromatography. **Journal Chromatography A**, v. 1217, p. 7616-7619, 2010.
83. LI, M.; MENG, X.; DIAO, E.; DU, F. Xylitol production by *Candida tropicalis* from corn cob hemicellulose hydrolysate in a two-stage fed-batch fermentation process. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 387-382, 2012.
84. LI, Y.; PARK, J.; SHIROMA, R.; IKE, M.; TOKUYASU, K. Improved ethanol and reduced xylitol production from glucose and xylose mixtures by the mutant strain of *Candida shehatae* ATCC 22984. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 166, p. 1781-1790, 2012.
85. LIAVOGA, A. B.; BIAN Y.; SEIB, P. A. Release of D-xylose from wheat straw by acid and xylanase hydrolysis and purification of xylitol. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 7758-7766, 2007.
86. LIMA, L. H. A.; BERLINCK, C. N. Xilitol, o adoçante do futuro. **Ciência hoje**, v. 33, n. 95, p. 66-69, 2003.
87. LING, H.; CHENG, K.; GE, J.; PING, W. Statistical optimization of xylitol production from corncob hemicellulose hydrolysate by *Candida tropicalis* HDY-02. **New biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 673-678, 2011.
88. LÓPEZ-ARENAS, T.; RATHI, P.; RAMÍREZ-JIMÉNEZ, E., SALES-CRUZ, M. Acid pretreatment of lignocellulosic biomass: Steady state and dynamic analysis. **Chemical Engineering Transactions**, v. 21, p. 445-450, 2010.
89. LUTERBACHER, J. S.; TESTER, J. W.; WALKER, L. P. High-solids biphasic CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 451-460, 2010.



90. MAIA, C. M.; GALVÃO, A. P. G. L. K.; MODESTA, R. C. D.; JÚNIOR, M. P. Consumer evaluation of ice cream with xylitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 341-347, 2008.
91. MÄKI-ARVELA, P.; SALMI, T.; HOLMBOM, B.; WILLFÖR, S.; MURZIN, D. Y. Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses- A Review. **Chemical Reviews**, v., 111, p. 5638-5666, 2011.
92. MÄKINEN, K. K. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? **Medical Hypotheses**, v.54, p.603-613, 2000.
93. MÄKINEN, K. K.; JÄRVINEN, K. L.; ANTTILA, C. H.; LUNTAMO, L. M.; VAHLBERG, T. Topical xylitol administration by parents for the promotion of oral health in infants: a caries prevention experiment at a Finnish Public Health Centre. **International Dental Journal**, v. 63, n. 4, p. 210–224, 2013.
94. MARTÍNEZ, E. A.; SILVA AJ, B., GIULIETTI, M., SOLENZALA, I. N. Downstream process for xylitol produced from fermented hydrolysate. **Enzyme Microbial Technology**, v. 40, p. 1185-1189, 2007.
95. MARTÍNEZ, M. L.; SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V. Production of xylitol and ethanol by *Hansenula polymorpha* from hydrolysates of sunflower stalks with phosphoric acid. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 160- 166, 2012.
96. MARVIN, W. A.; SCHMIDT, L. D.; BENJAAFAR, S.; TIFFANY, D. G.; DAOUIDIS, P. Economic optimization of a lignocellulosic biomass-to-ethanol supply chain. **Chemical Engineering Science**, v. 67, p. 68-79, 2012.
97. MATEO, S.; ROBERTO, I. C.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A. J. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 196-203, 2013.
98. MATTILA, P. T.; KANGASMAA, H.; KNUUTTILA, M. L. E. The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 54, n. 4, p. 548-51, 2005.
99. MATTILA, P. T.; SVANBERG, M. J.; KNUUTTILA, M. L. Increased bone volume and bone mineral content in xylitol-fed aged rats. **Gerontology**, v. 47, n. 6, p. 300-5, 2001.
100. MELAJA, A. J.; HAMÄLÄINEN, L. Process for making Xylitol. U.S. Patent n. 4.008.285. 18 jun. 1975, publ. 15/ 02/1977.
101. MERICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces complex*. **FEBS Journal**, v. 274, p. 976-989, 2007.

102. MIAKE, Y.; NOZUE, S.; MORIGUCHI, M.; YAMAZAKI, T. Original the ability of xylitol containing gum with calcified seaweed in preventing demineralization of tooth surfaces. **Journal Hard Tissue Biology**, v. 20, n. 2, p. 87-92, 2011.
103. MIAKE, Y.; SAEKI, Y.; TAKAHASHI, M.; YANAGISAWA, T. Remineralization effects of xylitol on demineralized enamel. **Journal of electron microscopy**, v. 52, n. 5, p. 471-476, 2003.
104. MISRA, S.; GUPTA, P.; RAGHUWANSHI, S.; DUTT, K.; SAXENA, R. K. Comparative study on different strategies involved for xylitol purification from culture media fermented by *Candida tropicalis*. **Separation and Purification Technology**, v. 78, n. 3, 266-273, 2011.
105. MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; GUPTA, P.; DUTT, K.; SAXENA, R. K. Fermentation behavior of osmophilic yeast *Candida tropicalis* isolated from the nectar of *Hibiscus rosa sinensis* flowers for xylitol production. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 393-402, 2012.
106. MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; SAXENA, R. K. Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1596–601, 2013.
107. MITIĆ-ĆULAFIĆ, D. S.; PAVLOVIĆ, M.; OSTOJIĆ, S.; KNEZEVIĆ-VUKCEVIĆ. Antimicrobial effect of natural food preservatives in fresh basil-based pesto spreads. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2013.
108. MIURA, M.; WATANABE, I.; SHIMOTORI, Y.; AOYAMA, M.; KOJIMA, Y.; KATO, Y. Microbial conversion of bamboo hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Wood Science Technology**, v. 47, n. 3, p. 515-522, 2013.
109. MONEDERO, V.; PÉREZ-MARTÍNEZ, G.; YEBRA, M. J. Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, p. 1003-1015, 2010.
110. MORAES, B. S.; JUNQUEIRA, T. L.; PAVANELLO, L. G.; CAVALETT, O.; MANTELATTO, P. E.; BONOMI, A.; ZAIAT, M. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**, v. 113, 825-835, 2014.
111. MORA-PALE, M.; MELI, L.; DOHERTY, T. V.; LINHARDT, R. J., DORDICK, J. S. Room Temperature Ionic Liquids as Emerging Solvents for the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. **Biotechnology**, v. 108, n. 6, p. 1229-1245, 2011.
112. MORITA, T. A.; SILVA, S. S. Inhibition of microbial xylitol production by acetic acid and its relation with fermentative parameters. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 84-86, p. 801-808, 2000.

113. MULLIN, J. W. Crystallization, 3<sup>a</sup> ed., Butterworths-Heinemann Press, Oxford, 1992.
114. MUSHTAQ, Z.; IMRAN, M.; ZAHOOR, T.; AHMED, R. S.; ARSHAD, M. U. Biochemical perspectives of xylitol extracted from indigenous agricultural by-product (*Mongbean hulls*) in rats modelling. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2013.
115. MUSSATTO S. I.; SANTOS J.C.; ROBERTO I. C. Effect of pH and activated charcoal adsorption on hemicellulosic hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 79, p. 590-596, 2004.
116. MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource and Technology**, v. 93, p. 1-10, 2004.
117. MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 401-413, 2002.
118. MUSSATTO, S. I.; SANTOS, J. C.; FILHO, W. C. R.; SILVA, S. S. A study on the recovery of xylitol by batch adsorption and crystallization from fermented sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 1840-1845, 2006.
119. NARAYANASWAMY, N.; FAIK, A.; GOETZ, D. J.; GU, T. Bioresource Technology Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 13, p. 6995-7000, 2011.
120. NONKLANG, S.; ABDEL-BANAT, B. M. A.; CHA-AIM, K.; MOONJAI, N.; HOSHIDA, H.; LIMTONG, S.; YAMADA, M. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7514-7521, 2008.
121. OKAMOTO, K.; KANAWAKU, R.; MASUMOTO, M.; YANASE, H. Enzyme and microbial technology efficient xylose fermentation by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 2, p. 96-100, 2012.
122. ORTIZ, M. E.; BLECKWEDEL, J.; RAYA, R. R.; MOZZI, F. Biotechnological and in situ food production of polyols by lactic acid bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, p. 4713-4726, 2013.
123. PAIVA, F. F. A; GARRUTI, D. S.; NETO, R. M. S. **Aproveitamento industrial do caju**, 2000.

124. PAL, S.; CHOUDHARY, V.; KUMAR, A.; BISWAS, D.; MONDAL, A. K.; SAHOO, D. K. Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource technology**, v. 147, p. 449-455, 2013
125. PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition re- view. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 2000.
126. PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 25-40, 1998.
127. PEDERSEN, M.; JOHANSEN, K. S.; MEYER, A. S. Low temperature lignocellulose pretreatment: effects and interactions of pretreatment pH are critical for maximizing enzymatic monosaccharide yields from wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 11, p. 1-10, 2011.
128. PENG, L.; LI-JUN, C.; GUO-XUE, L.; SHI-HUA, S.; LI-LI, W.; QI-YANG, J.; JIN-FENG, Z. Influence of furfural concentration on growth and ethanol yield of *Saccharomyces kluyveri*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 1528-1532, 2007.
129. PEREIRA, A. F. F.; SILVA, T. C.; CALDANA M. L.; MACHADO, M. A. A. M.; BUZALAF, M. A. R. Revisão de literatura: utilização do xilitol para a prevenção de otite média aguda. **International Archives Otorhinolaryngology**, v. 13, n. 1, p. 87-92, 2009.
130. PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE-LA-RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, p. 53-63. 2002.
131. PÉREZ-BIBBINS, B.; SALGADO, J. M.; TORRADO, A.; AGUILAR-USCANGA, M. G.; DOMÍNGUEZ, J. M. Culture parameters affecting xylitol production by *Debaryomyces hansenii* immobilized in alginate beads. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 387-397, 2013.
132. PETERSON, M. E. Xylitol. **Topics in companion animal medicine**, v. 28, p. 18-20, 2013.
133. PING, Y.; LING, H.-Z.; SONG, G.; GE, J.-P. Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 86-91, 2013.
134. POVELAINEN, M.; MIASNIKOV, A. N. Production of xylitol by metabolically engineered strains of *Bacillus subtilis*. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 24-31, 2010.
135. PRAKASH, G.; VARMA, A. J.; PRABHUNE, A.; SHOUCHE, Y.; RAO, M. Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose

using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3304-3308, 2011.

136. RAFIQU, I. S. M.; SAKINAH, M. M. Design of process parameters for the production of xylose from wood sawdust. **Chemical Engineering Research and Design**, v.90, n. 9, p. 1307-1312, 2012.

137. RAMESH, S.; R.MUTHUVELAYUDHAM, R.; KANNAN, R. R.; VIRUTHAGIRI, T. Stastical Optimization of process variables for corncob hemicellulose hydrolysate to xylitol by *Debaryomyces hansenii* var *hanseii*. **International Journal of ChemTech Research**, v. 5, n. 1, p. 186-196, 2013.

138. RANGASWAMY, S.; AGBLEVOR, F. A. Screening of facultative anaerobic bacteria utilizing D-xylose for xylitol production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 88-93, 2002.

139. RITTER, A. V; PREISSER, J. S.; CHUNG, Y.; BADER, J. D.; SHUGARS, D. A., AMAECHI, B.T., MAKHIJA, S. K.; FUNKHOUSER, K. A, Vollmer, W.M.. Risk indicators for the presence and extent of root caries among caries-active adults enrolled in the Xylitol for Adult Caries Trial (X-ACT). **Clinical oral investigations**, v.16, p. 1647-1657, 2012.

140. RIVAS, B.; TORRE, P.; DOMÍNGUEZ, J. M.; CONVERTI, A.; PARAJOÁ, J. C. Purification of xylitol obtained by fermentation of corncob hydrolysates. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4430-4435, 2006.

141. ROCHA, M. V. P. **Produção de bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por fermentação submersa**. Maria Valderez Ponte Rocha – Natal, RN: 162p. 2010. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Departamento de Engenharia Química.

142. ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1099-107, 2011.

143. RODRIGUES, M. R. C.; RONDINA, D.; ARAÚJO, A. A.; SOUZA, A. L., PINHEIRO D. C. N.; FERNANDES, A. A. O.; IBIAPINA, F. L. Respostas reprodutivas e metabólicas de ovelhas alimentadas com bagaço de caju desidratado, durante o pós-parto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n.1, p.171-179, 2011.

144. RODRIGUES, R. C. L. B.; KENEALY, W. R.; JEFFRIES, T. W. Xylitol production from DEO hydrolysate of corn stover by *Pichia stipitis* YS-30. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 10, p. 1649-55, 2011.

145. RODRUSSAMEE, N.; LERTWATTANASAKUL, N. HIRATA, K.; SUPRAYOGI; LIMTONG, S.; KOSAKA, T.; YAMADA, M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various

conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology**, v. 90, p. 1573-1586, 2011.

146. ROVNER, A. J.; NANSEL, T. R.; GELLAR, L. The effect of low-glycemic diet vs a standard diet on blood glucose levels and macronutrient intake in children with type 1 diabetes. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, p. 303-307, 2009.

147. RUFINO, A. R.; BIAGGIO, F. C.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Chemoenzymatic synthesis: a strategy to obtain xylitol monoesters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, p. 957-960, 2009.

148. SAJJAN, U.; MOREIRA, J.; LIU, M.; HUMAR, A.; CHAPARRO, C.; FORSTNER, J.; KESHAVJEE, S. A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: inhibition of *Burkholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xylitol. **The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation**, v. 23, n. 12, p. 1382-91, 2004.

149. SAMPAIO, F.C.; PASSOS, F. M. L.; FREDERICO, J. V.P., FAVERI, D. D.; PEREGO, P.; CONVERTI A.; FAVERI, D. D.; MANTOVANI, H.C.; PASSOS, F. M. L.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Xylitol crystalization from culture media fermented by yeasts, **Chemical Engineering and Processing**, v. 45, p.1041-1046, 2006.

150. SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; RIVALDI, J. D.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. **Journal of Food Engineering**, v. 86, n. 4, p. 542-548, 2008.

151. SANTOS, J. C.; CONVERTI, A.; CARVALHO, W. D.; MUSSATTO, S. I.; SILVIO, S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 113-118, 2005.

152. SANTOS, R. P.; SANTIAGO, A. A. X.; GADELHA, C. A. A.; CAJAZEIRAS, J. B.; CAVADA, B. S.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; SANTOS, R. P.; FREIRE, V. N. Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 1432-1437, 2007.

153. SANTOS, T. M. A. **Estudo da recuperação do xilitol produzido por fermentação do hidrolisado de bagaço de cana - de - açúcar utilizando zeólitas** – Campinas, SP: [s.n.], 2004. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

154. SASAKI, M.; JOJIMA, T.; INUI, M. Xylitol production by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 86, p. 1057-1066, 2010.

155. SASSNER, P.; MÅRTENSSON, C-G.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Steam pretreatment of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> -impregnated *Salix* for the production of bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 137-145, 2008.
156. SENE, L.; VITOLO, M.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Effect of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production in *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, n. 86, p. 371-380, 2000.
157. SHAO, X.; JIN, M.; GUSEVA, A.; LIU, C.; BALAN, V.; HOGSETT, D.; DALE, B. E.; LYND, L. Conversion for avicel and AFEX pretreated corn stover by *Clostridium thermocellum* and simultaneous saccharification and fermentation: Insights into microbial conversion of pretreated cellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8040-8045, 2011.
158. SILLS, D. L., GOSSETT, J. M. Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated biomasses. **Biotechnology**, v. 109, n. 2, p. 353-362, 2012a.
159. SILLS, D. L.; GOSSETT, J. M. Using FTIR spectroscopy to model alkaline pretreatment and enzymatic saccharification of six lignocellulosic biomasses. **Biotechnology**, v. 109, n. 4, p. 894-903, 2012b.
160. SILVA, A. F.; SUZUKI, E. Y.; FERREIRA, A. S.; OLIVEIRA, M. G.; SILVA, S. S.; RAPOSO, N. R. B. In Vitro inhibition of adhesion of *Escherichia coli* strains by xylitol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, n. 2, p. 235-241, 2011.
161. SILVA, A. S.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BOM, E. P. S. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7402-7409, 2010.
162. SILVA, O. O. **Aproveitamento do bagaço de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) para produção biotecnológica de xilitol**. Orlando de Oliveira Silva – Viçosa-MG, 2011, 121f. Tese (doutorado). Universidade Federal de Viçosa.
163. SILVA, S. S.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A. Xilitol: um adoçante alternativo para indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 5, p. 109-117, 1994.
164. SIRISANSANEEYAKUL, S.; WANNAWILAI, S.; CHISTI, Y. Repeated fed-batch production of xylitol by *Candida magnoliae* TISTR 5663. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 6, p. 1121-1129, 2013.
165. SOKMEN, A.; GUNES, G. Influence of some bulk sweeteners on rheological properties of chocolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1053-1058, 2006.

166. SRIVANI, K.; SETTY, Y. P. Parametric optimization of xylitol production from xylose by fermentation. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v.7, p. 280-284, 2012.
167. SU, B.; WU, M.; LIN, J.; YANG, L. Metabolic engineering strategies for improving xylitol production from hemicellulosic sugars. **Biotechnology Letters**, v. 35, p. 1781-1789, 2013.
168. SUZUKI, S.; SUGIYAMA, M.; MIHARA, Y.; HASHIGUCHI, K.; YOKOZEKI, K. Novel enzymatic method for the production of xylitol from D-arabitol by *Gluconobacter oxydans*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 12, p. 2614-2620, 2002.
169. TADA, K.; KANNO, T.; HORIUCHI, J. Enhanced production of bioxylitol from corn cobs by *Candida magnolia*, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 10008-10014, 2012.
170. TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330. 2004.
171. TAPIAINEN, T.; SORMUNEN, R.; KAIJALAINEN, T.; KONTIOKARI, T.; IKÄHEIMO, I.; UHARI, M. Ultrastructure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xylitol. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 54, n.1, p. 225-8, 2004.
172. TIAN, S.; ZHOU, G.; YAN, F.; YU, Y., YANG, X. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 656-660, 2009.
173. UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v. 19, p.144-7, 2000.
174. UITTAMO, J.; NIEMINEN, M. T.; KAIHOVAARA, P.; BOWYER, P., SALASPURO, M.; RAUTEMAA, R. Xylitol inhibits carcinogenic acetaldehyde production by *Candida species*. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 8, p. 2038-2041, 2011.
175. VAJZOVIC, A.; BURA, R.; KOHLMEIER, K.; DOTY, S. L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 II: production of xylitol and ethanol in the presence of inhibitors. **Journal of industrial microbiology & Biotechnology**, v. 39, 1453-63, 2012.
176. WANG, S.; LI, Q. S.; LI, Z.; SU, M. G. Solubility of xylitol in ethanol, acetone, N,N-dimethylformamide, 1-butanol, 1-pentanol, toluene, 2-propanol, and water. **Journal Chemical & Engineering Data**, v. 52, p. 186-188, 2007.
177. WANG, Y. M.; PATTERSON, J. H.; VAN EYS, J. The potential use of xylitol in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency anemia. **The Journal of clinical investigation**, v. 50, n. 7, p. 1421-8, 1971.



178. WEI, J.; YUAN, Q.; WANG, T.; WANG, L. Purification and crystallization of xylitol from fermentation broth of corncob hydrolysates. **Frontiers of Chemical Engineering in China**, v. 4, n. 1, 57-64, 2010.
179. WEI, N.; XU, H.; KIM, S. R.; JIN, Y-S. Deletion of FPS1, Encoding Aquaglyceroporin Fps1p, improves xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 10, p. 3193-3201, 2013.
180. WEST, T. P. Xylitol production by *Candida* species grown on a grass hydrolysate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 913-916, 2009.
181. WILKINS, M. R.; MUELLER, M.; EICHLING, S.; BANAT, I. M. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains under anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 346-350, 2008.
182. WINKELHAUSENA, E.; MALINOVSKAA, R. J.; VELICKOVAA, E.; KUZMANOVAA, S. Sensory and microbiological quality of a baked product containing xylitol as an alternative sweetener. **International Journal of Food Properties**, v. 10, n.3, p. 639-649, 2007.
183. XU, J., CHENG, J. J. Bioresource technology pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3861-3868, 2011.
184. YABLOCHKOVA, E. N.; BOLOTNIKOVA, O. I.; MIKHAILOVA, N. P. The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. **Microbiology**, v. 72, n. 4, p.414-417, 2003a.
185. YABLOCHKOVA, E. N.; BOLOTNIKOVA, O. I.; MIKHAILOVA, N. P.; NEMOVA, N. N.; GINAK, A. I. Specific Features of Fermentation of D-Xylose and D-Glucose by Xylose-Assimilating Yeasts. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 265-269, 2003b.
186. YIN, D. T.; JING, Q.; ALDAJANI, W. W.; DUNCAN, S.; TSCHIRNER, U.; SCHILLING, J.; KAZLAUSKAS, R. J. Improved pretreatment of lignocellulosic biomass using enzymatically-generated peracetic acid. **Bioresource technology**, v. 102, 5183-5192, 2011.
187. YLIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Advances Food Research**, v.25, p.159-180, 1979.
188. YU, G.; YANO, S.; INOUE, H. Pretreatment of rice straw by a hot-compressed water process for enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 160, 539-551, 2010.

189. ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology Bioengineering**, v.65, p.24–33, 1999.
190. ZHANG, J.; GENG, A.; YAO, C.; LU, Y.; LI, Q. Xylitol production from D-xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. **Bioresource technology**, v.105, p. 134-41, 2012.
191. ZHU, J. Y.; VERRILL, S. P.; LIU, H.; HERIAN, V. L.; PAN, X.; ROCKWOOD, D. L. On polydispersity of plant biomass recalcitrance and its effects on pretreatment optimization for sugar production. **Bioenergy Research**, v. 4, p.201-210, 2011.
192. ZHUANG, J.; LIN, L.; YONG, S.; PANG, C. Detoxification of wheat strew formic acid hydrolysis and xylitol production. **Advanced Materials Research**, v. 383-390, p. 5453-5457, 2011.
193. ZOU, Y. Z.; KAI, Q. I.; CHEN, X.; MIAO, X. L.; ZHONG, J. J. Favorable effect of very low initial  $k(L)a$  value on xylitol production from xylose by a self-isolated strain of *Pichia guilliermondii*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p.149-52, 2010.

---

## Capítulo 2

---

## **CAPÍTULO 2: POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE XILITOL POR TRÊS LEVEDURAS EM MEIOS DE CULTURA CONTENDO XILOSE E GLICOSE COMO FONTES DE CARBONO**

### **RESUMO**

Diversas vias para produção de xilitol, um poliálcool com poder edulcorante e anticariogênico de alta relevância para indústria alimentícia e farmacêutica, vêm sendo extensivamente estudadas nas últimas décadas. Uma das vias de sua síntese é a microbiológica, que se mostra promissora diante de benefícios, como menor custo operacional se comparado com o processo químico tradicional, que utiliza a hidrogenação da D-xilose. Dessa forma, esse estudo visou avaliar a produção de xilitol por três cepas de leveduras, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces marxianus* CCA 510 e *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, em meios sintéticos contendo D-xilose (Meio MX) e a mistura de D-xilose e D-glicose (Meio MXG) como fontes de carbono. Os cultivos foram realizados a 30 °C e 200 rpm em um agitador orbital durante 144h e coletadas amostras a cada 24h a fim de se analisar biomassa celular, açúcares consumidos e produção de xilitol e etanol. No meio MX, *K. marxianus* CCA510 foi a linhagem que produziu a concentração mais elevada de xilitol (17,04 g.L<sup>-1</sup>). No entanto, *K. marxianus* ATCC36907 e *Candida tropicalis* produziram 13,22 g.L<sup>-1</sup> e 9,54 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Além disso, em MXG, que continha glicose e xilose como fontes de carbono, foi observada uma menor produção de xilitol para todos os micro-organismos (*K. marxianus* CCA510 produziu 13,30 g.L<sup>-1</sup> de xilitol, enquanto *Candida tropicalis* e *K. marxianus* ATCC36907 produziram 11,42 g.L<sup>-1</sup> e 0,64 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente) além de notada a produção de etanol. De acordo com os resultados do estudo cinético, a formação de xilitol está associada ao crescimento microbiano e ao consumo de substrato (xilose), sendo comportamento típico de um metabólito primário para as três leveduras estudadas. Diante dos resultados obtidos, os micro-organismos utilizados podem ser promissores para estudos baseados na produção de xilitol a partir de substratos que contenham xilose e glicose como principais fontes de carbono.

**Palavras-chave:** Xilitol. Xilose. *Candida*. *Kluyveromyces*. Meios Sintéticos.

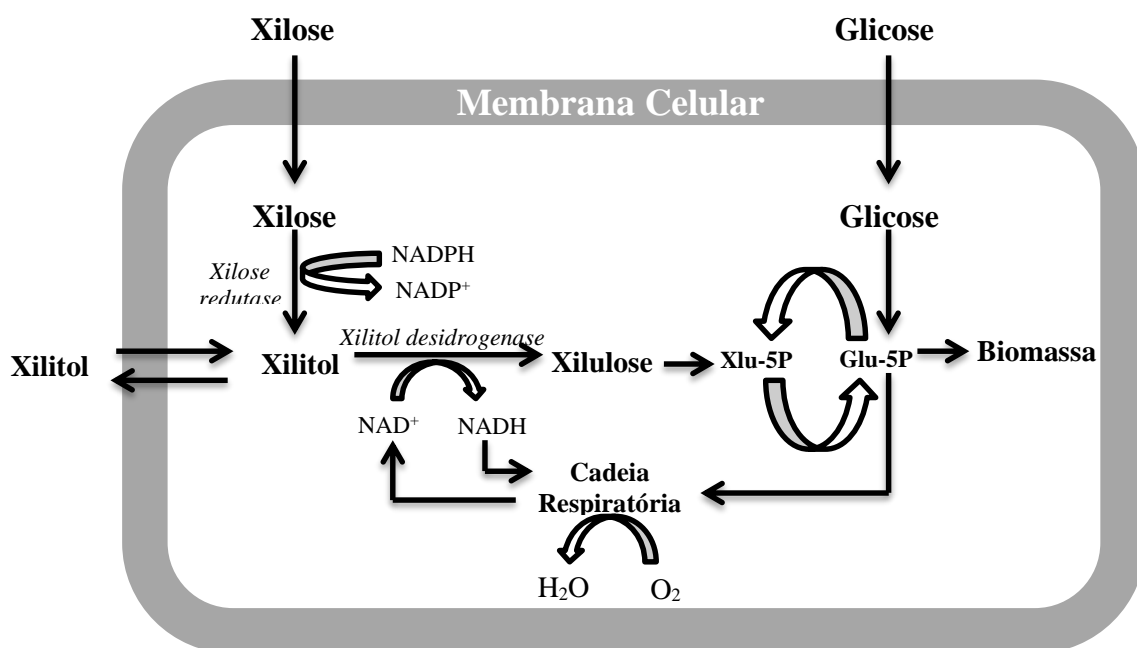
## 1 INTRODUÇÃO

O xilitol é um poliálcool com ampla aplicabilidade, desde a indústria alimentícia, na produção de alimentos acrescidos de edulcorantes, até a indústria farmacêutica, para produção de alguns medicamentos. Por ter teor de doçura comparada a da sacarose (GRANSTRÖM, IZUMORI e LEISOLA, 2007) pode ser utilizado na alimentação de pessoas com necessidades calóricas especiais, como em diabéticos (ISLAM, 2011). Essa substância vem sendo extensivamente estudada pelo seu poder anticariogênico (ANTONIO, PIERRO e MAIA; ANTTONEN *et al.*; SEKI *et al.*, 2011), ou seja, de combate a cáries causadas por micro-organismos presentes na cavidade bucal, como *Streptococcus mutans* (LEE, CHOI e KIM, 2011). Alguns autores justificam essa capacidade anticáries pelo fato do xilitol não ser metabolizado por muitos micro-organismos cariogênicos, tornando-o, assim, uma substância ideal para compor balas e gomas de mascar. Além disso, estudos comprovam a eficácia do xilitol na prevenção de otite média aguda (UHARI; TAPIAINEN; KONTIOKARI, 2000), fibrose cística (DURAIRAJ *et al.*, 2007) e osteoporose (MATTILA; SVANBERG; KNUUTTILA, 2001).

A produção de xilitol em escala industrial é feita por meio de processos químicos de hidrogenação da xilose, porém os mesmos são de alto custo operacional (HONGZHI *et al.*, 2011). Diante disso, muitas pesquisas têm buscado vias alternativas para a produção dessa substância de alto valor agregado, como as microbiológicas e/ou as enzimáticas. A literatura aponta diversos micro-organismos, dentre fungos filamentosos (BERGHÄLL *et al.*, 2007; OKAMOTO *et al.*, 2012), bactérias (RANGASWAMY e AGBLEVOR, 2002; SUZUKI *et al.*, 2002) e leveduras (ROCHA *et al.*, 2011; MISRA *et al.*; ZHANG *et al.*, 2012), capazes de metabolizar a xilose reduzindo-a a xilitol, sendo esses últimos citados como os mais promissores. O principal gênero de levedura avaliado quanto a produção biotecnológica de xilitol é *Candida* (ARRUDA *et al.*, 2011; GARCÍA *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2011; MISRA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012), contudo, outros gêneros também são citados como bons produtores, como *Kluyveromyces* (MUELLER, WILKINS e BANAT, 2010; ROCHA *et al.*, 2011), *Pichia* (RODRIGUES, KENEALY e JEFFRIES, 2011) e *Debaryomyces* (DIÉGUEZ *et al.*, 2011; PRAKASH *et al.*, 2011).

Sob condições microaeróbias, leveduras conseguem reduzir a D-xilose a xilitol, o qual é oxidado a xilulose posteriormente (Figura 2.1). Essas reações são catalisadas pelas enzimas xilose redutase (XR) (E.C. 1.1.1.21) e xilitol desidrogenase (E.C. 1.1.1.9), respectivamente (YABLOCHKOVA *et al.*, 2003), e é nesse conjunto de reações que se baseia a produção enzimática de xilitol. Estudos para extração e purificação de XR de células de leveduras objetivam caracterizar a enzima para melhorar o processo fermentativo obtendo a solução da enzima purificada para a conversão enzimática direta de xilose a xilitol (MAYERHOFF; ROBERTO; FRANCO, 2006).

**Figura 2.1:** Reação simplificada da metabolização de xilose e glicose por leveduras.



**Fonte:** Adaptado de Tochampa *et al.* (2005).

Estudos recentes têm buscado a obtenção de xilitol a partir de matérias-primas não convencionais residuais da agroindústria, tais como bagaço de cana de açúcar (PRAKASH *et al.*, 2011), palha de arroz (HUANG *et al.* 2011), sabugo de milho (HONGZHI *et al.*, 2011), resíduos hortícolas (ZHANG *et al.*, 2012) e bagaço de caju (ROCHA *et al.*, 2011). A composição química de hidrolisados hemicelulósicos varia

amplamente dependendo da matéria-prima utilizada para sua obtenção, procedimentos de hidrólise e dos métodos de pré-tratamento empregados. Assim, estudos que primeiramente visam à produção biotecnológica em meios sintéticos, contendo glicose e xilose como fontes de carbono, são de importância fundamental, pois por meio deles pode se observar se a presença de glicose reprimirá o consumo de xilose e, adicionalmente, se a produção de etanol a partir de glicose provocará redução na produção de xilitol (RODRUSSAMEE *et al.*, 2011). O estudo dos micro-organismos a serem empregados e das condições para diminuir esse efeito são importantes, pois contribuem para otimização do tempo e melhoria do processo mesmo antes dos experimentos com materiais lignocelulósicos.

Diante do exposto, nesse capítulo apresenta-se um estudo sobre a potencialidade da produção de xilitol por três estirpes microbianas, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces marxianus* CCA 510 e *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 a partir de meio de cultivo contendo apenas D-xilose e a mistura de D-glicose e D-xilose como únicas fontes de carbono.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados (*C. tropicalis*, *K. marxianus* CCA 510 e *K. marxianus* ATCC 36907) pertencem ao Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBIO) da Universidade Federal do Ceará. *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 foi adquirida da Coleção de Culturas Tropicais - CCT na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia - André Tosello. *Kluyveromyces marxianus* CCA 510, levedura do banco de cultura do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular - LACAM, da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, Brasil. As culturas foram armazenadas em Ágar YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) inclinado (extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup>, peptona 20 g.L<sup>-1</sup>, dextrose, 20 g.L<sup>-1</sup>, e ágar, 20 g.L<sup>-1</sup>) a 4 °C e em caldo YEPD (extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup>, peptona 20 g.L<sup>-1</sup> e dextrose, 20 g.L<sup>-1</sup>) contendo glicerol (50%) a -8°C.

### 2.2 Condições de cultivo

Para preparo do inóculo, realizou-se repique das culturas em placas de Petri contendo Ágar YEPD, as quais foram incubadas a 30 °C por um período de 48h em estufa bacteriológica. Após isso, transferiram-se três colônias para o meio de inóculo (glicose, 20 g.L<sup>-1</sup>, ureia, 0,4 g.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 g.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,18 g.L<sup>-1</sup>, e extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup>) o qual foi mantido em agitador orbital (Tecnal – TE 422) a 200 rpm por 24h. Decorrido esse tempo, a concentração celular foi medida por absorbância (ao comprimento de onda de 600 nm) em espectrofotômetro, calculada utilizando curvas padrões em base de massa seca, e ajustada para 1,0 g.L<sup>-1</sup>. As células, após centrifugadas, foram lavadas com água destilada esterilizada e utilizadas como inóculo.



### 2.3 Condições de produção de xilitol

Utilizaram-se dois meios de fermentação distintos para os micro-organismos estudados. O primeiro meio (MX) contendo apenas xilose como fonte de carbono (D-xilose, 40 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup> e (NH<sub>4</sub>)SO<sub>2</sub>, 5 g.L<sup>-1</sup>) e o segundo (MXG) contendo tanto xilose como glicose (D-xilose, 40 g.L<sup>-1</sup>, D-glicose, 20 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup> e (NH<sub>4</sub>)SO<sub>2</sub>, 5 g.L<sup>-1</sup>). O pH do meio foi ajustado para 6,0 (). Os meios (50 mL) foram acondicionados em frascos Erlenmeyer de 250 mL e esterilizados a 110 °C por 10 min em autoclave, após isso, adicionou-se o inóculo (1,0 g.L<sup>-1</sup>). Os ensaios foram conduzidos em triplicata a 200 rpm e 30 °C. Amostras foram coletadas a cada 24h até um tempo total de fermentação de 144h para quantificação de biomassa e análise de açúcares consumidos e produtos formados (WANG *et al.*, 2012).

### 2.4 Métodos Analíticos

Glicose, xilose e xilitol foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um sistema de CLAE (Waters, Milford, MA, E.U.A.) equipado com um detector de índice de refração Waters e com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio Rad, Hercules, CA, USA). O eluente foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup> em água deionizada (MiliQ Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) com vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> a 65 °C. O volume de cada amostra foi de 20 µL. O crescimento microbiano, em biomassa seca, foi monitorado por meio da determinação da densidade ótica ao comprimento de onda de 600 nm. Utilizou-se uma curva de calibração em função da concentração celular e da densidade ótica para se obter as equações para biomassa seca, que relacionam a absorbância (ABS<sub>600nm</sub>) com a concentração celular (g.L<sup>-1</sup>) dos micro-organismos.

Os parâmetros cinéticos estimados foram: taxa específica de crescimento celular ( $\mu_X$ ); consumo de xilose ( $\mu_{SI}$ ); consumo de glicose ( $\mu_{S2}$ ) e produção de xilitol ( $\mu_P$ ), definido nas Eqs. 1-4, respectivamente:

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$\mu_{S_1} = -\frac{1}{X} \frac{dS_1}{dt} \quad (2)$$

$$\mu_{S_2} = -\frac{1}{X} \frac{dS_2}{dt} \quad (3)$$

$$\mu_{P_1} = -\frac{1}{X} \frac{dP_1}{dt} \quad (4)$$

Sendo  $X$  é a concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ),  $S_1$  é a concentração de xilose ( $\text{g.L}^{-1}$ ),  $S_2$  é a concentração de glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $P$  é a concentração de xilitol ( $\text{g.L}^{-1}$ ),

O rendimento em biomassa ( $Y_{X/S_1}$ ) e em xilitol ( $Y_{P/S_1}$ ), baseadas no consumo de xilose, foram estimadas utilizando meio MX. As produtividades de biomassa, baseadas no consumo de xilose e glicose ( $Y_{X/S}$ ), produtividade de xilitol baseada no consumo de xilose ( $Y_{P/S_1}$ ), foram estimadas utilizando meio MXG. As taxas de produtividade volumétrica de xilitol ( $Q_{P_1}$ ) foram determinadas para ambos os meios.

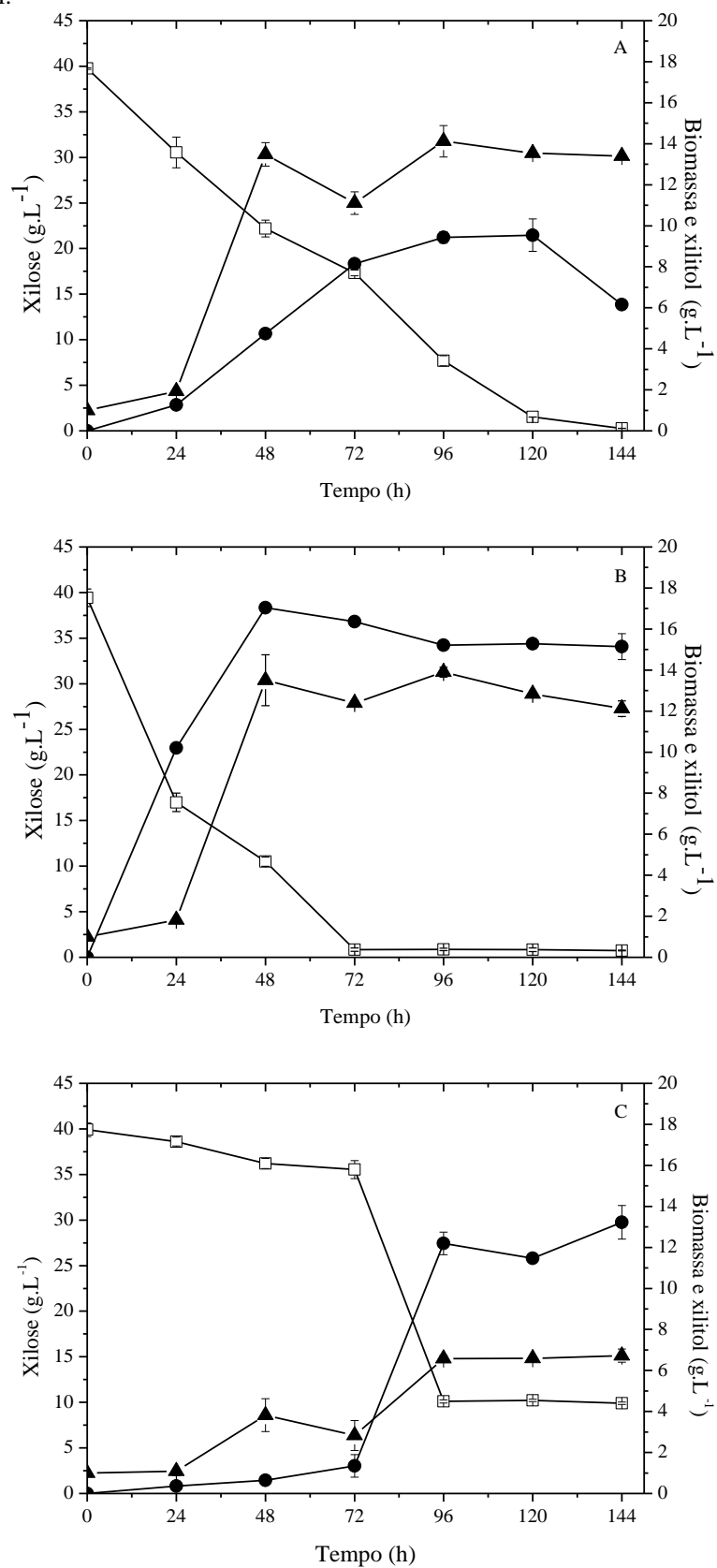
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de xilitol por três leveduras em meios sintéticos contendo apenas xilose (40 g.L<sup>-1</sup>) e contendo xilose com glicose (40 g.L<sup>-1</sup> e 20 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente) foi avaliada. A Figura 2.2 (A, B e C) apresenta o consumo de D-xilose e produção de biomassa e xilitol em função do tempo pelas leveduras no meio MX. Analisando-se os resultados (Figura 2.2) para o meio composto apenas por xilose como fonte de carbono (MX), observa-se que, em 96h de fermentação, o micro-organismo que obteve maior concentração em biomassa foi *C. tropicalis*, com  $14,12 \pm 0,77$  g.L<sup>-1</sup>, seguido por *K. marxianus* CCA 510,  $13,90 \pm 0,24$  g.L<sup>-1</sup>. Salienta-se que *K. marxianus* ATCC 36907 alcançou biomassa de  $6,72 \pm 0,32$  g.L<sup>-1</sup> em intervalo de tempo de 144h, mostrando ter um crescimento mais lento em relação as outras duas cepas. Arruda *et al.* (2011) avaliaram a produção das enzimas-chave (XR e XDH) para produção de xilitol por *Candida guilliermondii* em meio composto por hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (com 74,99 g.L<sup>-1</sup> de xilose) e notaram uma produção máxima de biomassa celular de 10,60 g.L<sup>-1</sup> em 120 horas de fermentação. Já Kumar *et al.* (2009) estudaram a produção de xilitol e etanol por uma cepa de *K. marxianus* a partir de meio contendo xilose como fonte de carbono, alcançando-se uma biomassa de  $4,30 \pm 0,1$  g.L<sup>-1</sup> em 50h de fermentação.

Com o presente estudo foi possível avaliar o potencial dessas estirpes para a produção de xilitol a partir de meios de cultivo contendo glicose e xilose como fontes majoritárias de carbono. Nos ensaios em que o meio continha glicose e xilose (MXG), observou-se uma maior concentração em biomassa por *C. tropicalis* ( $17,19 \pm 0,01$  g.L<sup>-1</sup>), já as cepas *K. marxianus* CCA510 ( $13,48 \pm 0,01$  g.L<sup>-1</sup>) e *K. marxianus* ATCC36907 ( $5,64 \pm 0,03$  g.L<sup>-1</sup>) tiveram redução, o que mostra que a glicose presente não foi utilizada para crescimento celular desses micro-organismos, mas provavelmente para a produção de etanol (Figura 2.2B e 2.2C, respectivamente).

Observa-se que apenas a cepa CCA510 (2B) foi capaz de consumir praticamente toda xilose (restando apenas  $0,75 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$ ) em tempo inferior a 80h de fermentação, sendo que *C. tropicalis* (2A) levou aproximadamente 120h para consumir aproximadamente a mesma quantidade de substrato (concentração final de  $0,27 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ ). Por sua vez, *K. marxianus* ATCC36907 (4C) não utilizou toda fonte de carbono em até 144h de fermentação, restando ao final desse período uma concentração de xilose de  $9,89 \pm 0,13 \text{ g.L}^{-1}$ , correspondendo a 24,78% do açúcar presente no início da fermentação.

**Figura 2.2:** Fermentação no meio MX para avaliar a produção de xilitol a 30 °C e 200 rpm por *C. tropicalis* (A), *K. marxianus* CCA 510 (B) e *K. marxianus* 36907 (C): (▲) biomassa, (□) xilose e (●) xilitol.

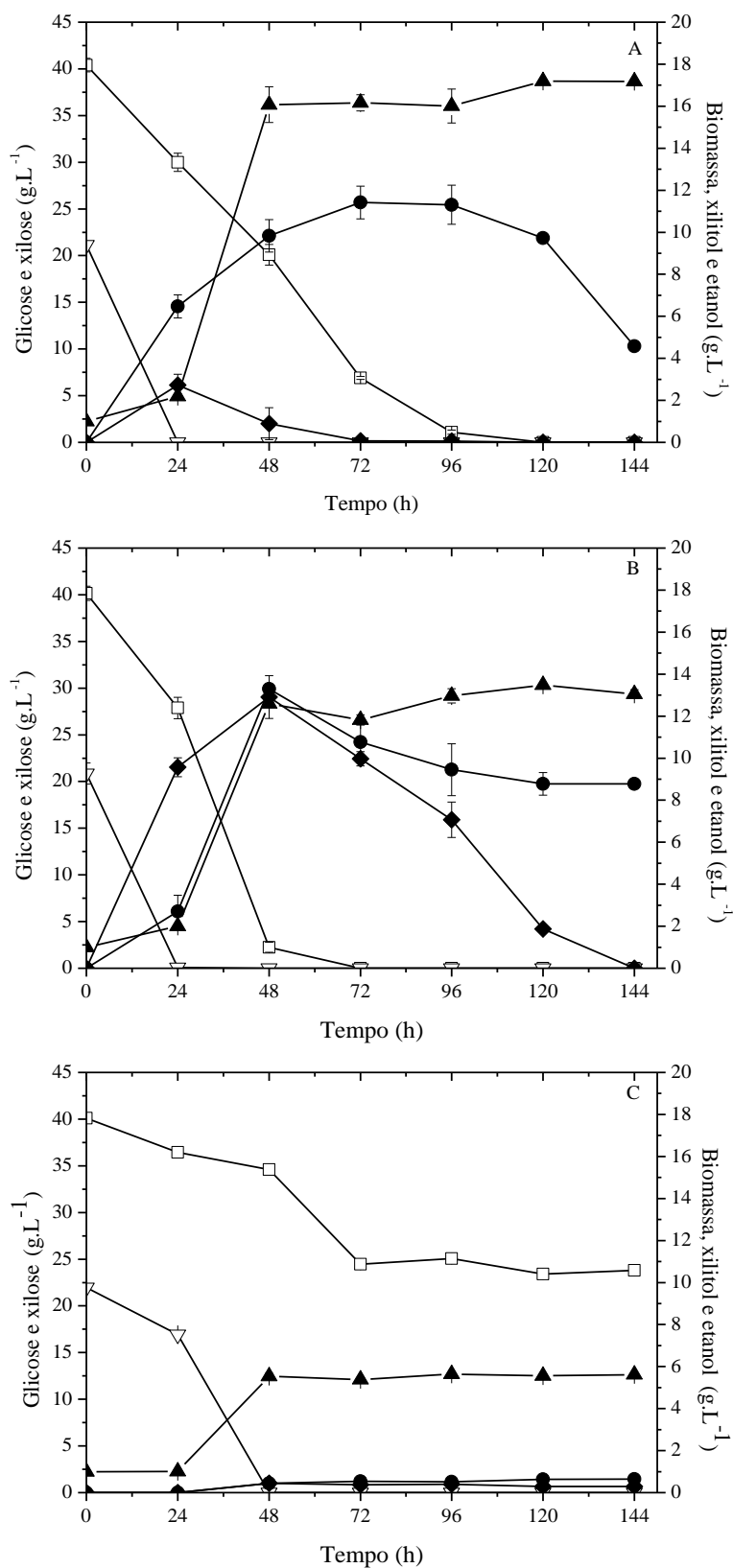


A Figura 2.3 (A, B e C) mostra o consumo de glicose, xilose e produção de biomassa, xilitol e etanol nos ensaios realizados com o meio MXG pelas leveduras estudadas. Observa-se o completo consumo de glicose por *C. tropicalis* e *K. marxianus* CCA510, sendo também a xilose consumida concomitantemente por esses micro-organismos. Já *K. marxianus* ATCC36907 somente consumiu toda glicose presente no meio após 24h de fermentação. A levedura *K. marxianus* CCA510, dentre as cepas estudadas, foi a que consumiu mais rapidamente toda a xilose, sendo essa 100% utilizada em até 72h de fermentação. *C. tropicalis* só consumiu toda a xilose após 120h de fermentação e *K. marxianus* ATCC 36907 assimilou aproximadamente 41% da xilose presente ao final das 144h de ensaios.

Bura, Vajzovic e Doty (2012) observaram a produção de xilitol e etanol pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* PTD3 I em meio sintético contendo a mistura de glicose e xilose. Os autores notaram rápido consumo de glicose, em tempo inferior a 24h, e consumo da xilose em tempo superior a 72h, comportamento similar com o observado no presente trabalho, reforçando a rápida assimilação de glicose em detrimento de outros substratos que é apresentada na literatura.

Tochampa *et al.* (2005) estudaram, utilizando meios sintéticos contendo xilose e glicose em razões de concentração variadas, a produção de xilitol por *Candida mogii* em um biorreator em batelada. Esses autores observaram que na ausência da glicose *C. mogii* consumiu xilose para produzir xilitol e biomassa. Além disso, o poliálcool começou a ser produzido mais rapidamente quando a glicose não estava contida no meio. Já quando ambos os substratos estavam presentes, a glicose foi consumida mais rapidamente que xilose. Esse comportamento foi também verificado nesse trabalho, onde se observou que a glicose foi consumida rapidamente ainda nas horas iniciais de fermentação, sendo utilizada para produção de biomassa e etanol.

**Figura 2.3:** Fermentação no meio MXG para avaliar a produção de xilitol a 30 °C e 200 rpm por *C. tropicalis* (A), *K. marxianus* CCA 510 (B) e *K. marxianus* 36907 (C): (▲) biomassa, (□) xilose, (▽) glicose, (●) xilitol e (◆) etanol.



Após o consumo da glicose, a enzima que converte xilose a xilitol (XR) é ativada e a produção de xilitol acelerada (TOCHAMPA *et al.*, 2005). A levedura poderá, ainda, conduzir a xilose para o interior celular mesmo na presença da glicose, porém terá a produção de xilose redutase inibida, dessa forma, concentrações reduzidas de glicose em detrimento de xilose são requeridas para maximizar a produção de xilitol. A literatura também apresenta diversos estudos que utilizam hidrolisados hemicelulósicos para a produção de xilitol, como bagaço de cana-de-açúcar (ARRUDA *et al.*; BRANCO, SANTOS e SILVA, 2011), farelo de arroz (EL-BAZ, SHETAIA e ELKHOULI, 2011) e sabugo de milho (LI *et al.*, 2010), sendo observado que a concentração de xilose presente no meio composto a partir desses resíduos hidrolisados possui concentração de xilose consideravelmente superior a de glicose.

Tanto no meio contendo apenas xilose quanto no meio contendo xilose e glicose, a levedura que se destacou na produção de xilitol foi *K. marxianus* CCA510, tendo alcançando produção máxima de xilitol de  $17,04 \pm 0,19 \text{ g.L}^{-1}$  no meio MX, e de  $13,30 \pm 0,17 \text{ g.L}^{-1}$  no meio MXG. *C. tropicalis* produziu  $9,54 \pm 0,79 \text{ g.L}^{-1}$  no meio MX e  $11,42 \pm 0,78 \text{ g.L}^{-1}$  no meio MXG. Por outro lado, *K. marxianus* ATCC36907 foi capaz de produzir uma quantidade significativa de xilitol no meio MX ( $13,22 \pm 0,82 \text{ g.L}^{-1}$ ), mas, quando cultivada na presença de glicose, não foi detectada quantidade relevante do bioproduto ( $0,45 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$ ), uma vez que provavelmente a glicose foi utilizada para produção de etanol.

No meio MXG, o qual possuía glicose ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) em sua composição, observou-se, ainda, produção de etanol pelas três leveduras em quantidades variadas. Sendo *K. marxianus* CCA510 a estirpe que alcançou maior produção ( $12,91 \text{ g.L}^{-1}$ ), seguida por *C. tropicalis* ( $2,73 \text{ g.L}^{-1}$ ) e *K. marxianus* ATCC36906 ( $0,45 \text{ g.L}^{-1}$ ). Esse comportamento já era esperado devido a rota metabólica de hexoses e pentoses, uma vez que leveduras, geralmente, utilizam a glicose para produção de etanol (SASAKI, JOJIMA e INUI, 2010) e a xilose é assimilada para a produção de xilitol (CHEN *et al.*, 2010).

Alguns estudos avaliam a produção de xilitol por leveduras a partir de meios sintéticos contendo xilose. Zhang *et al.* (2012), por exemplo, estudaram a produção de xilitol a partir de D-xilose por *Candida athensensis* SB18, que foi capaz de consumir



concentrações acima de 300 g.L<sup>-1</sup> de D-xilose, produzindo 256,5 g.L<sup>-1</sup> de xilitol e produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) de 0,97 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, sendo esse valor 2,26 vezes maior que o alcançado pela cepa *K. marxianus* CCA510 utilizada no presente trabalho (Tabela 2.1). Já o rendimento de xilitol ( $Y_{P/S}$ ) alcançado por *C. athensensis* SB18 foi de 0,87 g.g<sup>-1</sup>, enquanto de *K. marxianus* CCA510 foi de 0,589 g.g<sup>-1</sup>.

Avaliando o rendimento em biomassa ( $Y_{X/SI}$ ) no meio MX (Tabela 2.1), pode-se observar que a cepa que apresentou o melhor desempenho foi de *C. tropicalis* (0,409 g<sub>biomassa</sub>/g<sub>xilose</sub>). Contudo, essa linhagem não teve um desempenho melhor na produção de xilitol ( $Y_{PI/SI} = 0,294$  g<sub>xilitol</sub>/g<sub>xilose</sub>), com 96h de fermentação, comparada com *K. marxianus* CCA510 ( $Y_{PI/SI} = 0,428$  g<sub>xilitol</sub>/g<sub>xilose</sub>) em 72h, que, por sua vez, atingiu  $Y_{X/SI}$  de 0,295 g<sub>biomassa</sub>/g<sub>xilose</sub>. Ao se analisar, no meio MX, a produtividade volumétrica ( $Q_{PI}$ ), que relaciona a produção de xilitol (g.L<sup>-1</sup>) e o tempo de fermentação (h), pode-se concluir que  $Q_{PI}$  na ordem decrescente foram obtidos com as cepas *K. marxianus* CCA510, *K. marxianus* ATCC36907 e *C. tropicalis*, com 0,227, 0,127 e 0,098 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente.

Ao se avaliar os resultados de  $Y_{X/S}$ ,  $Y_{PI/SI}$  e  $Q_{PI}$  em MXG, nota-se um comportamento diferente dos micro-organismos comparando-se com o meio contendo apenas xilose como fonte de carbono. A cepa que alcançou maior rendimento em biomassa foi *C. tropicalis* (0,248 g<sub>biomassa</sub>/g<sub>xilose+glicose</sub>), seguida por *K. marxianus* CCA510 (0,177 g<sub>biomassa</sub>/g<sub>xilose+glicose</sub>) e *K. marxianus* ATCC36907 (0,125 g<sub>biomassa</sub>/g<sub>xilose+glicose</sub>). A produtividade de xilitol ( $Y_{PI/SI}$ ) foi maior quando se utilizou *K. marxianus* CCA510 (0,351 g<sub>xilitol</sub>/g<sub>xilose</sub>). Considerando-se a produtividade volumétrica,  $Q_P$ , a linhagem com melhor desempenho foi *K. marxianus* CCA510 (0,554 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), seguida por *C. tropicalis* (0,476 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e *K. marxianus* ATCC36907 (0,023 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

Os resultados em relação à produtividade de xilitol por *C. tropicalis* e *K. marxianus* CCA510 são satisfatórios, visto que são próximos ou até superiores aos observados por alguns autores que também avaliaram essa produção biotecnológica. Sasaki, Jojima e Inui (2010), por exemplo, utilizaram uma cepa de *Corynebacterium glutamicum* para produção de xilitol em meio sintético em condições limitadas de oxigênio e obtiveram  $Q_P$  de apenas 0,01 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Carvalheiro *et al.* (2007) obtiveram uma produtividade máxima de xilitol de 0,51 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> utilizando *Debaryomyces*

*hansenii* para fermentação de hidrolisado de grãos de cervejaria. Li *et al.* (2011) realizaram experimentos com *C. tropicalis* para produção de xilitol a partir de hidrolisado de sabugo de milho e obteve um  $Q_P$  de  $0,61 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Misra *et al.* (2012) utilizou um meio sintético contendo apenas xilose ( $50 \text{ g.L}^{-1}$ ) como fonte de carbono e testou diferentes leveduras quanto a produção de xilitol, sendo que a levedura que alcançou uma produtividade volumétrica mais elevada foi *C. tropicalis* ( $0,055 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

Para a produção biotecnológica de xilitol, a escolha do micro-organismo baseia-se na condição da absorção simultânea de glicose e xilose, de modo que a glicose é catabolizada para proporcionar a estrutura de carbono para o crescimento celular e diminuir a potência (NADH) para redução de xilose em xilitol. No entanto, para muitos micro-organismos, a absorção e/ou utilização de açúcares secundárias, como a xilose, é adiada quando a glicose, o carbono preferencial como fonte de energia, está presente. Esse fenômeno é conhecido como repressão catabólica de carbono e, para a produção por via microbiana de xilitol, a eliminação dessa repressão, é essencial para a absorção simultânea de glicose e xilose (GABOR *et al.*, 2011).

**Tabela 2.1:** Rendimento em biomassa,  $Y_{X/S1}$  ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e  $Y_{X/S}$  ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), rendimento em xilitol,  $Y_{P1/S}$  ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), produtividade de xilitol,  $Q_{P1}$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), e produtividade máxima de xilitol,  $P_I^{max}$ , por *C. tropicalis*, *K. marxianus* CCA510 e *K. marxianus* ATCC36907 em meio MX e MXG.

Meio MX				Meio MXG			
Parâmetros	<i>C. tropicalis</i> <sup>i</sup>	<i>K. marxianus</i> CCA510 <sup>ii</sup>	<i>K. marxianus</i> ATCC36907 <sup>i</sup>	Parâmetros	<i>C. tropicalis</i> <sup>ii</sup>	<i>K. marxianus</i> CCA510 <sup>iii</sup>	<i>K. marxianus</i> ATCC36907 <sup>ii</sup>
$Y_{X/S1}$	0,409	0,295	0,187	$Y_{X/S}$	0,248	0,177	0,125
$Y_{P1/S1}$	0,294	0,428	0,409	$Y_{P1/S1}$	0,341	0,351	0,035
$Q_{P1}$	0,098	0,227	0,127	$Q_{P1}$	0,476	0,554	0,023
$P_I^{max}$	$9,43 \pm 0,28$	$16,36 \pm 0,01$	$12,20 \pm 0,55$	$P_I^{max}$	$11,42 \pm 0,78$	$13,30 \pm 0,17$	$0,54 \pm 0,00$

(i) A 96h de fermentação; (ii) A 72 h de fermentação e (iii) a 48 h de fermentação.

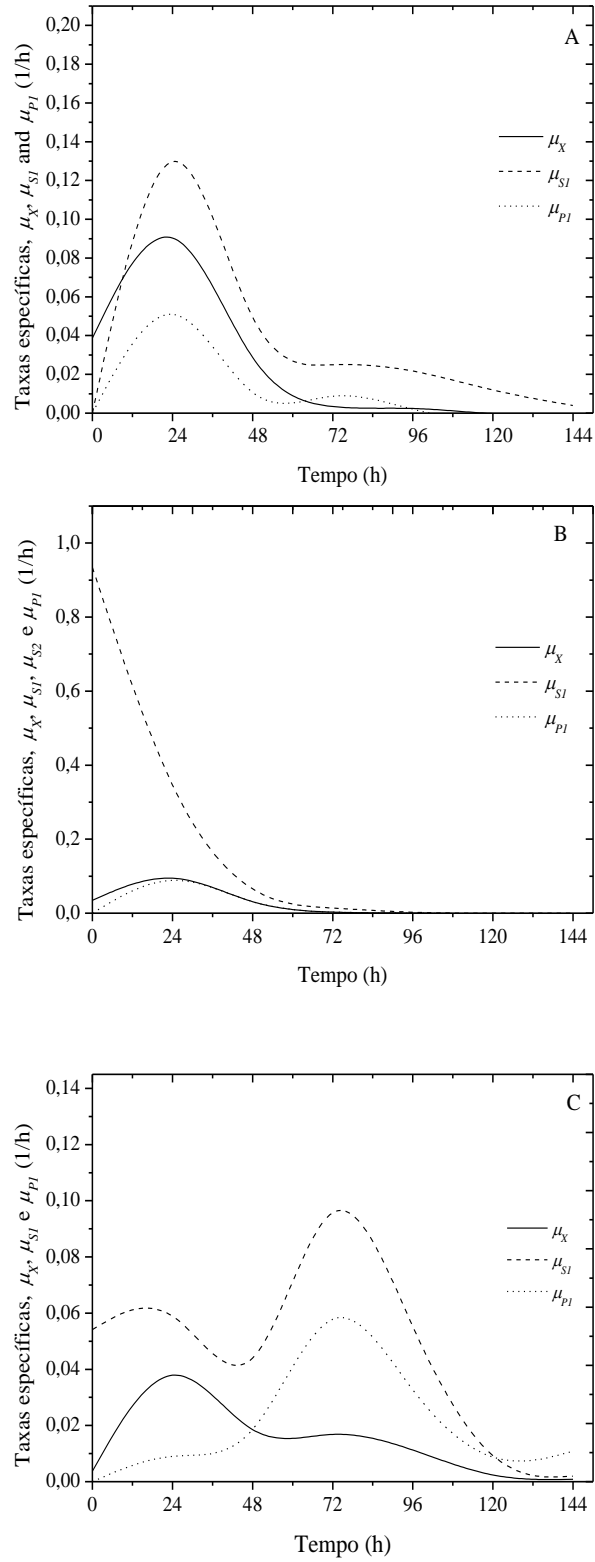
Observação 1:  $Y_{X/S1}$ : rendimento em biomassa em relação ao consumo de xilose.

Observação 2:  $Y_{X/S}$ : rendimento em biomassa em relação ao consumo de xilose + glicose.

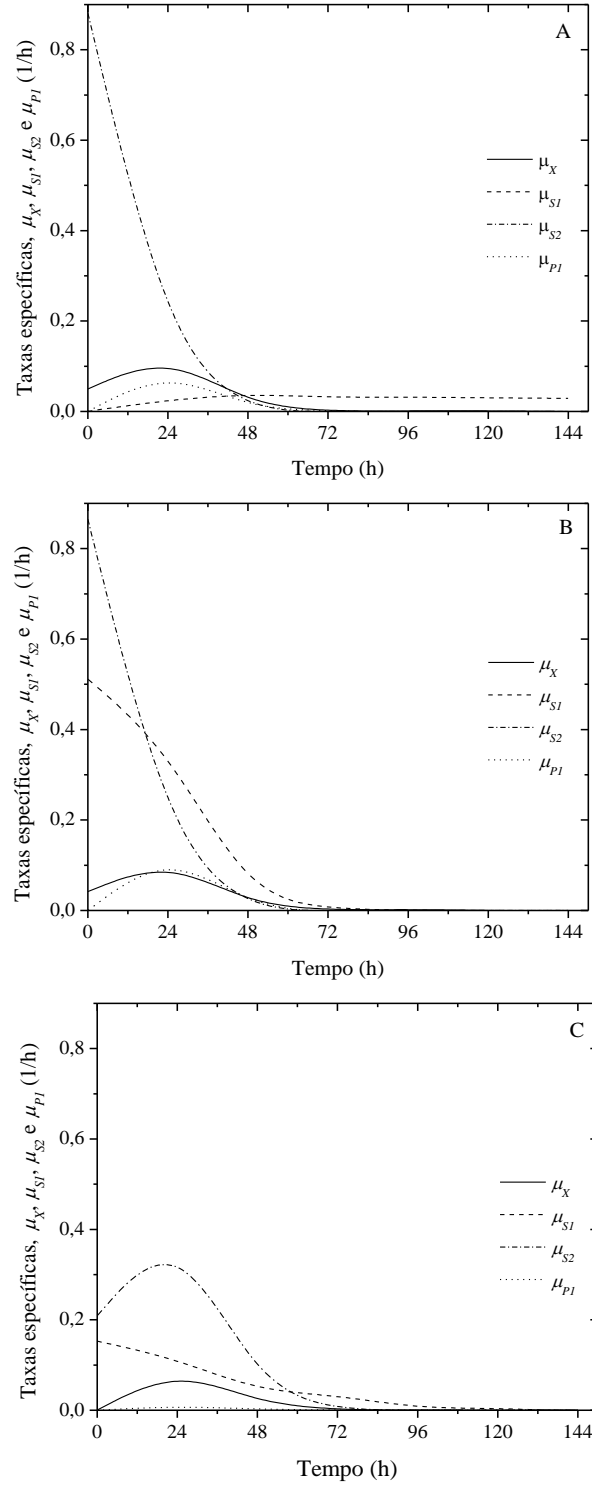
A Figura 2.4(A-C) apresenta as taxas específicas de crescimento ( $\mu_X$ ), consumo de xilose ( $\mu_{SI}$ ) e produção de xilitol ( $\mu_{PI}$ ) para a fermentação no meio MX por *C. tropicalis*, *K. marxianus* CCA510 e *K. marxianus* ATCC36907, respectivamente. Diferentes perfis foram obtidos para três leveduras estudadas nesse trabalho. Para *C. tropicalis* e *K. marxianus* ATCC36907, as taxas específicas de crescimento ( $\mu_X$ ), consumo de xilose ( $\mu_{SI}$ ) e produção de xilitol ( $\mu_{PI}$ ) apresentaram perfis similares. As taxas obtidas no estudo cinético utilizando *K. marxianus* ATCC36907 foram as mais lentas, sendo que biomassa máxima, produção máxima de xilitol e consumo de substrato foram alcançados a 72h de cultivo (Figura 2.3C). *K. marxianus* CCA510 apresentou maior taxa específica do consumo de xilose ( $\mu_{SI}$ ), observando-se um consumo total de xilose em 72 h de processo, o que não ocorreu com as outras leveduras. A taxa específica de crescimento ( $\mu_X$ ) é, aproximadamente, constante após 48h de fermentação para esta levedura. De acordo com os resultados ilustrados nas Figuras 2.4A-C, a formação de xilitol está associado com o crescimento e o consumo de substrato (xilose), que é um comportamento típico de um metabólito primário.

A Figura 2.5 (A-C) mostra as taxas específicas de crescimento ( $\mu_X$ ), o consumo de xilose ( $\mu_{SI}$ ), o consumo de glicose ( $\mu_{S2}$ ) e produção de xilitol ( $\mu_{PI}$ ) para o meio de fermentação de MXG por *C. tropicalis*, *K. marxianus* CCA510 e *K. marxianus* ATCC36907, respectivamente. O comportamento dos três micro-organismos foi semelhante em MXG meio, no entanto, a taxa de consumo de glicose foi maior em todos os casos, indicando que a xilose foi consumida apenas em uma segunda etapa. As taxas específicas de produção de xilitol e biomassa e o perfil de consumo dos açúcares presentes no meio, também demonstram o metabolismo primário para a produção de xilitol.

**Figura 2.4:** Taxa de crescimento específico ( $\mu_X$ , —), consumo de xilose ( $\mu_{S1}$ , - -) e produção de xilitol ( $\mu_{P1}$ , ...) durante fermentação no meio MX por *C. tropicalis* (A), *K. marxianus* CCA510 (B) e *K. marxianus* ATCC36907 (C) a 30 °C e 200 rpm.



**Figura 2.5:** Taxa de crescimento específico ( $\mu_X$ , —), consumo de xilose ( $\mu_{S1}$ , — —), consumo de glicose ( $\mu_{S2}$ , - · -) e produção de xilitol ( $\mu_{P1}$ , ...) durante fermentação no meio MXG por *C. tropicalis* (A), *K. marxianus* CCA510 (B) e *K. marxianus* ATCC36907 (C) a 30 °C e 200 rpm.



## 4 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesse capítulo demonstram o potencial das leveduras estudadas para a produção de xilitol, especialmente das cepas *Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus* CCA510, que tiveram produção máxima de xilitol de  $11,42 \pm 0,78 \text{ g.L}^{-1}$  e  $13,30 \pm 0,17 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, quando avaliadas em meio composto por glicose e xilose, que representam os principais açúcares presentes em biomassa lignocelulósica. Conclui-se, assim, que essas leveduras são potenciais produtoras de xilitol a partir de meios de culturas compostos por hidrolisados de resíduos agroindustriais, uma vez que esses materiais possuem como principais açúcares que os constituem glicose e xilose, devendo ser estudadas mais extensivamente em pesquisas posteriores.

## 5 REFERÊNCIAS

1. ANTONIO, A. G.; PIERRO, V. S. S.; MAIA, L. C. Caries preventive effects of xylitol-based candies and lozenges: a systematic review. **Journal of Public Health Dentistry**, v. 71, n.13, p.117-124, 2011.
2. ANTONEN, V.; HALUNEN, I., PÄKKILÄ, J., LARMAS, M.; TJÄDERHANE, L. A practice-based study on the effect of a short sucrose/xylitol exposure on survival of primary teeth caries free. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 22, n. 5, p. 356-362, 2011.
3. ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. D. C. L. B.; SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. D. G. D. A. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, v. 22, n. 4, p. 815-22, 2011.
4. BERGHÄLL, S.; HILDITCH, S.; PENTTILÄ, M.; RICHARD, P. Identification in the mould *Hypocrea jecorina* of a gene encoding an NADP+: D-xylose dehydrogenase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, p. 249-253, 2007.
5. BRANCO, F. R.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3241-3246, 2011.
6. BURA, R.; VAJZOVIC, A.; DOTY, S. L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. **Journal of Industrial Microbiology & bBiotechnology**, v. 39, n. 7, p. 1003-1011, 2012.
7. CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MEDEIROS, R.; GÍRIO, F. M. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: effect of supplementation. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1887-1891, 2007.
8. CHEN, X.; JIANG, Z-H.; CHEN, S.; QIN, W. Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application. **International Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 7, p. 834-844, 2010.
9. DIÉGUEZ, C. G.; SALGADO, J. M.; ROCA, E.; DOMÍNGUEZ, J. M. Kinetic modelling of the sequential production of lactic acid and xylitol from vine trimming wastes. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 34, n. 7, p. 869-78, 2011.
10. DURAIRAJ, L.; LAUNSPACH, J.; WATT, J. L.; MOHAMAD, Z.; KLINE, J.; ZABNER, J. Safety assessment of inhaled xylitol in subjects with cystic fibrosis. **Occupational Medicine**, v. 6, p. 31-34, 2007.



11. EL-BAZ, A. F.; SHETAIA, Y. M.; ELKHOULI, R. R. Xylitol production by *Candida tropicalis* under different statistically optimized growth conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 68, p. 15353-15363, 2011.
12. GABOR, E.; GOHLER, A. K.; KOSFELD, A.; STAAB, A.; KREMLING, A.; JAHREIS, K. The phosphoenolpyruvate-dependent glucose-phospho-transferase system from *Escherichia coli* K-12 as the center of a network regulating carbohydrate flux in the cell. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 711-720, 2011.
13. GARCÍA, F. J.; SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V.; CUEVAS, M.; RIGAL, L.; GASET, A. Xylitol production from olive-pruning debris by sulphuric acid hydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*. **Holzforschung**, v. 65, n. 1, p. 59-65, 2011.
14. GRANSTRÖM, T.B., IZUMORI, K., LEISOLA, M. A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, p. 277-281, 2007.
15. HONGZHI, L.; KEKE, C.; JINGPING, G.; WENXIANG, P. Statistical optimization of xylitol production from corncob hemicellulose hydrolysate by *Candida tropicalis* HDY-02. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, 2011.
16. HUANG, C.-F.; JIANG, Y.-F.; GUO, G.-L.; WANG, W.-S. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3322-3329, 2011.
17. ISLAM, S. Effects of xylitol as a sugar substitute on diabetes-related parameters in nondiabetic rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 5, p.505-511, 2011.
18. KUMAR, S.; SINGH, S. P.; MISHRA, I. M.; ADHIKARI, D. K. Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IPE453. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, p. 1483-1489, 2009.
19. LEE, S. H.; CHOI, B. K.; KIM, Y. J. The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 6, p. 697-703, 2011.
20. LI, H.; CHAI, X.; ZHAN, H.; FU, S. Rapid determination of furfural in biomass hydrolysate by full evaporation headspace gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7616-7619, 2010.
21. LI, M.; MENG, X.; DIAO, E.; DU, F. Xylitol production by *Candida tropicalis* from corn cob hemicellulose hydrolysate in a two-stage fed-batch fermentation process. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 387-392, 2011.

22. MATTILA, P. T.; SVANBERG, M. J.; KNUUTTILA, M. L. E. Increased bone volume and bone mineral content in xylitol-fed aged rats. **Gerontology**, v. 47, p. 300-305, 2001.
23. MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; FRANCO, T. T. Response surface methodology as an approach to determine the optimal activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase enzymes from *Candida Mogii*. **Applied Microbiology**, p. 761-767, 2006.
24. MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; GUPTA, P.; DUTT, K.; SAXENA, R. K. Fermentation behavior of osmophilic yeast *Candida tropicalis* isolated from the nectar of *Hibiscus rosa sinensis* flowers for xylitol production. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 393-402, 2012.
25. MUELLER, M.; WILKINS, M. R.; BANAT, I. M. Screening of *Kluyveromyces marxianus* IMB strains at microaerophilic conditions for xylitol production. **American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting**, p. 1105-1114, 2010.
26. OKAMOTO, K.; KANAWAKU, R.; MASUMOTO, M.; YANASE, H. Enzyme and microbial technology efficient xylose fermentation by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 2, p. 96-100, 2012.
27. PRAKASH, G.; VARMA, A. J.; PRABHUNE, A.; SHOUCHE, Y.; RAO, M. Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3304–3308, 2011.
28. RANGASWAMY, S.; AGBLEVOR, F. A. Screening of facultative anaerobic bacteria utilizing D-xylose for xylitol production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 88-93, 2002.
29. ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1099-107, 2011.
30. RODRIGUES, R. C. L. B.; KENEALY, W. R.; JEFFRIES, T. W. Xylitol production from DEO hydrolysate of corn stover by *Pichia stipitis* YS-30. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 10, p. 1649-55, 2011.
31. RODRUSSAMEE, N.; LERTWATTANASAKUL, N.; HIRATA, K.; SUPRAYOGI, LIMTONG, S.; KOSAKA, T.; YAMADA, M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, p. 1573-86, 2011.

32. SASAKI, M.; JOJIMA, T.; INUI, M.; YUKAWA, H. Xylitol production by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1057-1066, 2010.
33. SEKI, M.; KARAKAMA, F.; KAWATO, T.; TANAKA, H.; SAEKI, Y.; YAMASHITA, Y. Effect of xylitol gum on the level of oral mutans streptococci of preschoolers: block-randomised trial. **International Dental Journal**, v. 61, p. 274-280, 2011.
34. SUZUKI, S.; SUGIYAMA, M.; MIHARA, Y.; HASHIGUCHI, K.; YOKOZEKI, K. Novel enzymatic method for the production of xylitol from D-arabitol by *Gluconobacter oxydans*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 12, p. 2614-20, 2002.
35. TOCHAMPA, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; VANICHSRIRATANA, W.; SRINOPHAKUN, P.; BAKKER, H. H. C.; CHISTI, Y. A model of xylitol production by the yeast *Candida mogii*. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 28, p. 175-183, 2005.
36. UHARI, M., TAPIAINEN, T., KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v. 19, p. 144-147, 2000.
37. WANG, L.; DAPENG, W.; PINGWAH, T.; XIAOGUANG, F.; QIPENG, Y. Xylitol production from corncob hydrolysate using polyurethane foam with immobilized *Candida tropicalis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1106-1113, 2012.
38. YABLOCHKOVA, E. N.; BOLOTNIKOVA, O. I.; MIKHAILOVA, N. P.; NEMOVA, N. N.; GINAK, A. I. The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in Yeasts. **Microbiology**, v. 72, n. 4, p.414-417, 2003.
39. ZHANG, J.; GENG, A., YAO, C., LU, Y., LI, Q.). Xylitol production from d-xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. **Bioresource technology**, v.105, p. 134-41, 2012.

---

## Capítulo 3

---

### **CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILITOL NO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CAJU**

#### **RESUMO**

A busca pela utilização de resíduos descartados pela agroindústria tem sido de grande importância. No Brasil, especialmente na região Nordeste, há um grande excedente de bagaço de caju (BC), que é obtido após extração do suco e da amêndoa. Estudos no país têm se voltado ao emprego desse produto como matéria-prima para a produção de bioprodutos, como forma de destino a esse excedente e agregação de valor. O BC pode ser submetido a um pré-tratamento, como o que utiliza ácido diluído, e fornecer consideráveis quantidades de açúcares fermentescíveis, como xilose e glicose, por sua vez, esses açúcares podem ser assimilados por via microbiana e dar origem a xilitol e etanol, por exemplo. Durante o processo de hidrólise do resíduo inibidores do processo fermentativo, como furfurais e ácidos, são formados, levando a necessidade, em alguns casos, da submissão do hidrolisado a tratamentos de destoxificação. Esses tratamentos podem eliminar ou reduzir a níveis compatíveis com os tolerados pelos micro-organismos os possíveis inibidores presentes. Diante disso, o presente capítulo tratou da avaliação de diferentes condições na produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de caju (HBC), estudando, ainda, a atuação de carvão ativado na destoxificação do hidrolisado. Além disso investigou-se a influência da adição de diferentes fontes de nitrogênio na produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC). Os resultados mostraram que carvão ativado pode reduzir o teor de inibidores microbianos na fermentação, principalmente de compostos fenólicos. *Kluyveromyces marxianus* CCA510 e *Candida tropicalis* foram capazes de produzir xilitol a partir do HBC, sendo as maiores produtividades 0,36 g.g<sup>-1</sup> e 0,43 g.g<sup>-1</sup>, respectivamente. As fontes de nitrogênio influenciaram no crescimento dos micro-organismos, porém não se mostraram eficazes para a melhoria significativa da produção de xilitol. Diante dos resultados apresentados, pode-se considerar o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju como um potencial meio de cultivo para produção biotecnológica de xilitol e que tratamentos de destoxificação podem ser empregados para redução de possíveis compostos tóxicos presentes no meio sem perdas significativas de açúcares.

**Palavras-chave:** Bagaço de Caju. Inibidores. Fontes de nitrogênio.

## 1 INTRODUÇÃO

O aproveitamento de resíduos agroindustriais é de crescente importância no campo científico, devendo-se isso a necessidade constante da diminuição dos impactos ambientais ocasionais pela ação humana na natureza. Nesse contexto, diversos materiais descartados, principalmente a partir da indústria agroindustrial, têm sido avaliados quanto ao seu reaproveitamento e, conseqüente, agregação de valor. Materiais vegetais são fontes de matéria-prima potenciais para produção de energia e produtos de alta valorização, sendo cerca de 180 bilhões de toneladas produzidas anualmente (dos quais 40% m/m são celulose e 30% m/m hemicelulose) (MÄKI-ARVELA *et al.*, 2011).

Apenas uma pequena quantidade de celulose, hemicelulose e lignina, produzida como subproduto na agricultura é utilizada, sendo o restante considerado resíduo. Assim, diversos estudos vêm sendo realizados para o aproveitamento dos açúcares fermentescíveis, como glicose e xilose, liberados após hidrólise dessa biomassa. A xilose pode ser convertida, por ação química, enzimática ou microbiológica a xilitol, um poliol com ampla aplicabilidade na indústria alimentícia e na indústria farmacêutica. A literatura mostra que a utilização de micro-organismos para a conversão desse açúcar tem se apresentado viável em diferentes processos envolvendo materiais lignocelulósicos, como caules de girassol (MARTÍNEZ, SÁNCHEZ e BRAVO, 2012), colmo de bambu (MIURA *et al.*, 2013), serragem de madeira (RAFIQUL e SAKINAH, 2012), palha de trigo (ZHUANG *et al.*, 2011), bagaço de cana de açúcar (ARRUDA *et al.*, 2011), sabugo de milho (LI *et al.*, 2012), palha de centeio (FRANCESCHIN *et al.*, 2011), dentre outros.

O Brasil é um dos maiores produtores de caju do mundo. Em 2011, a área aproximada para produção de castanha de caju, principal subproduto do fruto para exportação, foi de 756 000 hectares, sendo a região Nordeste a maior responsável pela produção nacional. Destaca-se ainda que os estados com maior participação nessa produção são: Ceará (55,5%), Piauí (22,1%), Rio Grande do Norte (15,6%), Maranhão (2,3%), Pernambuco (1,9%), Bahia (1,9%) e Paraíba (0,8%) (IBGE, 2011).

O bagaço do caju (BC), que é um subproduto agrícola da extração de suco do pseudofruto, representa aproximadamente 20% m/m do peso total do pedúnculo, sendo uma das maiores fontes de resíduos da indústria agrônômica do setor (SANTOS

*et al.*, 2007). A utilização desse subproduto tem sido restrito a complementação nutricional para ração animal (RODRIGUES *et al.*, 2011), existindo, portanto a necessidade da realização de pesquisas que viabilizem seu uso para a produção de produtos de valor agregado, como xilitol. Diante disso, o estudo da utilização do resíduo descartado na Indústria do caju para a produção de xilitol se torna uma solução interessante.

A xilose é um dos carboidratos que compõe a estrutura hemicelulósica da biomassa vegetal, assim, essa precisa ser tratada de forma adequada para liberação do açúcar, tornando-o apto a ser fermentado por micro-organismos. A hidrólise ácida, que pode utilizar concentrações diluídas de ácidos, é muito difundida devido à eficiência do processo na obtenção de açúcares, porém, ocorre nesse processo a formação de produtos considerados tóxicos ao crescimento microbiano, como ácido acético e ácido fórmico. A concentração de compostos inibidores no meio fermentativo deve ser considerada como parâmetro de projeto, além do rendimento do produto desejado. A existência de compostos tóxicos no substrato pode provocar fermentações incompletas e prolongadas, tornando o processo ineficaz. (SILVA, 2011).

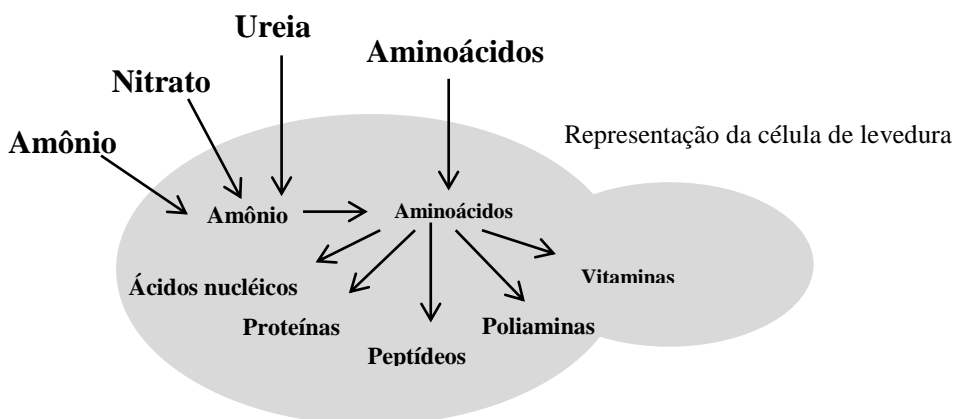
O tratamento do hidrolisado para redução de compostos tóxicos é investigado por diversos autores, sendo um dos princípios mais utilizados para essa destoxificação o emprego de carvão ativado. Muitos autores reportam a utilização desse procedimento para destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos objetivando a produção de xilitol por fermentação, como em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar (PRAKASH *et al.*, 2011), de sabugo de milho (LI *et al.*, 2012; MISRA, RAGHUWANSHI e SAXENA, 2013) e bagaço de abacaxi (SILVA, 2011).

Dentre os métodos utilizados na destoxificação dos hidrolisados hemicelulósicos a adsorção com carvão ativado é muito difundida por ser um tratamento simples e que pode ser utilizado em conjunto com outros métodos, como alcalinização. Em geral o processo é realizado em batelada, adicionando-se o carvão ativado ao hidrolisado e mantendo-o sob agitação por determinado tempo e temperatura, havendo a remoção de ácido acético, compostos fenólicos derivados de lignina, furanos (furfural e 5-HMF) e clarificação. A principal desvantagem desse método é a limitação quanto a reutilização do carvão, uma vez que sua capacidade de adsorção se esgota de forma irreversível em poucos ciclos de operação (SILVA, 2011).

Ainda existe uma escassez de estudos, portanto lacunas na literatura científica, que determinem parâmetros ótimos para a produção de xilitol por via microbiana a partir de hidrolisados hemicelulósicos. Dentre os trabalhos existentes, a maioria têm se voltado apenas à avaliação do crescimento microbiano e consumo dos açúcares presentes em determinados hidrolisados e a potencialidade de produção de algum bioproduto (CHEN *et al.*, 2010; FRANCESCHIN *et al.*, 2011; DASHTBAN *et al.*; KAMAT *et al.*, 2013). Alguns estudos retratam ainda aspectos influentes no processo para a produção do poliol, como temperatura (KUMAR *et al.*, 2009), pH (SOLEIMANI e TABIL, 2013), presença de inibidores (VAJZOVIC *et al.*, 2012) e aeração (WALTHER, HENSIRISAK e AGBLEVOR, 2001).

As fontes de nitrogênio empregadas em fermentações, em muitos casos, são de essencial importância para o crescimento microbiano (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998). Em geral, os meios de fermentação industrial empregam fontes de nitrogênio na forma orgânica, como ureia ou uma mistura complexa de aminoácidos (extrato de levedura e peptona) e na forma de nitrogênio inorgânico, tais como sulfato de amônio. Os íons amônio, suplementados ao meio ou derivados do catabolismo de compostos nitrogenados, são transportados e assimilados ativamente pelas leveduras para síntese de aminoácidos (Figura 3.1). Glutamato e glutamina são, dessa forma, os produtos primários da assimilação do amônio e são compostos fundamentais tanto para o metabolismo de carbono quanto para o de nitrogênio. A ureia é amplamente utilizada por leveduras como fonte de nitrogênio orgânico e, dependendo de sua concentração extracelular, pode ser assimilada pela célula por transporte ativo ou difusão facilitada. Ressalta-se em relação ao emprego de ureia que essa fonte de nitrogênio possui baixo custo (WALKER, 1998).

**Figura 3.1:** Visão geral da assimilação de nitrogênio por leveduras (Walker, 1998).





Alguns estudos têm mostrado que a fonte de nitrogênio fornecida ao micro-organismo na composição do meio composto por hidrolisados hemicelulósicos, pode influenciar significativamente na produção de xilitol (KO *et al.*, 2008; RODRIGUES, KENEALY e JEFFRIES, 2011).

Dessa maneira, investigou-se a influência do tratamento de destoxificação utilizando carvão ativo no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju visando a produção de xilitol por *Candida tropicalis* e por *Kluyveromyces marxianus* CCA510. Além disso, realizou-se uma investigação acerca da influência da adição individual de diversas fontes de nitrogênio ao hidrolisado de bagaço de caju para o processo fermentativo visando à produção de xilitol por essas leveduras.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada no capítulo 3 está descrita de forma resumida nas Figuras 3.2 e 3.3 ao final da seção de material e métodos. No presente capítulo, selecionaram-se *Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus* CCA510, que foram os micro-organismos que se destacaram nos experimentos apresentados no Capítulo 2.

### 2.1 Micro-organismos

*Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus* CCA510 foram utilizadas nos experimentos. Os micro-organismos foram armazenados em Ágar YEPD (*Yeast Extract Peptone and Dextrose*) (extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup>; peptona, 20 g.L<sup>-1</sup>; dextrose 20 g.L<sup>-1</sup> e ágar 20 g.L<sup>-1</sup>) inclinado a  $\pm 5$  °C.

### 2.2 Caracterização do bagaço

O bagaço de caju (BC) foi gentilmente cedido pela indústria de sucos Sucos do Brasil (Jandaia). O BC, in natura e após tratamento com o ácido sulfúrico, foi caracterizado quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, baseando-se nas metodologias desenvolvidas por Rocha *et al.* (1997) e validada por Gouveia *et al.* (2009).

#### 2.2.1 Determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas

Em béqueres foram colocados aproximadamente 2g do bagaço de caju triturado e adicionado 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% v/v, sob vigorosa agitação, em um banho termostatzado a  $45 \pm 5$  °C por 7 min, sendo os experimentos realizados em triplicata. Após este tempo a reação foi interrompida pela adição de 50 mL de água destilada e todo o conteúdo do béquer foi transferido quantitativamente para Erlenmeyer de 500 mL, onde o volume total de água foi elevado para 275 mL. Os frascos Erlenmeyer foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 121°C. Após a descompressão da autoclave, o frasco foi retirado e resfriado à temperatura ambiente,

sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo. A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume posteriormente completado com água destilada e armazenada para análises posteriores dos açúcares (xilose, glicose e arabinose), ácidos orgânicos, furfural, 5-hidroximetilfurfural e lignina solúvel.

### 2.2.2 Determinação da lignina insolúvel em meio ácido

A lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método *Klason* modificado por Rocha *et al.* (1997). O material retido no papel de filtro foi lavado com 1500 mL de água destilada, para remoção de ácido residual (até pH próximo de 7,0) e transferido para cadinhos para secagem em estufa a 105 °C até massa constante. A relação entre o peso do resíduo, descontando-se a massa de cinzas presente na lignina e o peso inicial da amostra foi utilizada para a determinação da porcentagem de lignina insolúvel presente no bagaço de caju (Equação 3.1).

$$\%Lignina\ insolúvel = \frac{MK-MC}{MA} * 100 \quad (\text{Equação 3.1})$$

Onde:

MK – massa de lignina insolúvel seca (g);

MC – massa de cinzas (g);

MA – massa da amostra seca (g).

### 2.2.3 Determinação da lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. Desta forma, alíquotas de 5,0 mL provenientes da fração líquida do material armazenado foram diluídas em balões volumétricos e alcalinizadas com solução de NaOH 6M até atingirem pH 12,0, e analisadas em espectroscopia de UV. O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme as Equações 3.2 e 3.3, conforme descrito por Gouveia *et al.* (2009).

*Conc. de lignina solúvel*

$$= (4,187 \times 10^{-2} * (A_{t280} - A_{pd280}) - 3,279 \times 10^{-4}) \text{ (Equação 3.2)}$$

$$A_{pd280} = (C_{furf} * \varepsilon_{furf}) + (C_{HMF} * \varepsilon_{HMF}) \text{ (Equação 3.3)}$$

Onde:

Conc. de lignina solúvel: concentração de lignina solúvel (g.L<sup>-1</sup>);

A<sub>t280</sub>: absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação em 280 nm;

A<sub>pd280</sub>: absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e 5-hidroximetilfurfural), cujas concentrações C<sub>Furf</sub> e C<sub>HMF</sub> foram determinadas previamente por CLAE e Furf e HMF - são as absorvâncias e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L.g<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, conforme determinado experimentalmente por Rocha *et al.* (1997).

## 2.2.4 Determinação do teor de cinzas totais

Para a determinação do teor de cinzas do bagaço, cerca de 1,0 grama da amostra (pesada em balança analítica) foi colocada em um cadinho de porcelana previamente tarado e aquecido em mufla elétrica a 800 °C por 2h. As cinzas foram determinadas pela diferença de peso das amostras, antes e após a incineração (Equação 3.4). Antes de serem pesadas as amostras foram colocadas em dessecador até atingirem temperatura ambiente.

$$\%Cinzas = \frac{MC * 100}{MA} \text{ (Equação 3.4)}$$

Onde:

MC: massa de cinzas (g);

MA: massa da amostra seca (g).

## **2.3 Hidrólise e tratamentos do bagaço de caju**

O bagaço de caju (BC) utilizado nos experimentos foi lavado três vezes para retirada de sujidades remanescentes do processamento industrial. Após seco em estufa de circulação de ar a  $55 \pm 5$  °C, o BC foi triturado e selecionado em partículas de tamanho entre 0,17 mm a 0,84 mm (20 e 80 “*meshs*”). O bagaço (20 % m/v) foi hidrolisado a temperatura de 121 °C por 30 min com ácido sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6 mol. L<sup>-1</sup> (Condições selecionadas baseadas em estudo concluído por Rocha *et al.*, 2010). A fração sólida foi separada da fração líquida por filtração, sendo essa última utilizada como meio nas fermentações. O hidrolisado teve pH ajustado para 6,0 com adição de Ca(OH)<sub>2</sub>. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## **2.4 Condições de fermentação para avaliar a produção de xilitol**

### **2.4.1 Inóculo**

Para preparo do inóculo, três colônias dos micro-organismos testados, previamente crescidas em Ágar YEPD foram transferidas para meio de inóculo (glicose, 20 g.L<sup>-1</sup>, ureia, 0,4 g.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 g.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,18 g.L<sup>-1</sup>, e extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup>), que foi mantido sob agitação a 200 rpm por 24h a 30 °C. Alíquotas do meio foram retiradas para cálculo da biomassa por meio da curva de crescimento de cada micro-organismo. A quantidade de meio correspondente a 1 g.L<sup>-1</sup> de células foi centrifugada, descartando-se o sobrenadante assepticamente. A massa celular precipitada foi lavada com água destilada estéril e utilizada como inóculo.

## **2.5 Estudo do tratamento de destoxificação do hidrolisado de bagaço de caju**

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC) foi concentrado por evaporação visando aumentar a concentração de xilose. Após isso foi submetido a tratamento para destoxificação: adicionou-se carvão ativado em grânulos ou em pó 3 %

m/v e em seguida manteve-se sob agitação a 200 rpm por 2h e 30 °C. Para meio de fermentação utilizou-se o HBC, que foi obtido como descrito no item 2.3 do presente capítulo. A fim de se avaliar a influência de tratamentos do uso de carvão ativado como forma de destoxificar o HBC para produção de xilitol, alguns tratamentos foram realizados, como indica a Tabela 3.1.

**Tabela 3.1:** Legendas dos tratamentos realizados no HBC para avaliar produção de xilitol

<b>Sigla</b>	<b>Tratamento</b>
HBC-1	Hidrolisado não foi concentrado após ajuste do pH
HBC-2	Hidrolisado concentrado sem tratamento
HBC-3	Hidrolisado concentrado tratado com carvão ativado em grânulos
HBC-4	Hidrolisado concentrado tratado com carvão ativado em pó

### **2.5.1 Meio de cultivo para avaliação da influência das fontes de nitrogênio**

A hidrólise ácida do BC foi realizada como descrita no item 2.3 desse capítulo. Após se obter o HBC com o pH ajustado, adicionaram-se as seguintes fontes de nitrogênio de forma individual na concentração de 3 g.L<sup>-1</sup>: ureia, sulfato de amônio e extrato de levedura. Os meios (a um volume de 50 mL) foram então esterilizados em frascos *Erlenmeyer* (125 mL) a 110 °C por 10 min em autoclave.

Os experimentos foram conduzidos em triplicata e o tempo total de fermentação foi de 120h, sob temperatura de 30 °C e agitação de 200 rpm. Amostras foram coletadas a cada 24h para análise de consumo de açúcares e formação de produtos como descrito no item 2.4 (ROCHA *et al.*, 2011).

## 2.6 Métodos analíticos

### 2.6.1 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético, ácido acético, furfural, 5-hidroximentilfurfural (5-HMF), xilitol e etanol.

A concentração de açúcares (glicose, xilose, arabinose) bem como concentração de furfural, 5-HMF, xilitol e etanol foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um sistema de CLAE (Waters, Milford, MA, E.U.A.) equipado com um detector de índice de refração Waters e com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio Rad, Hercules, CA, USA). O eluente foi  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mmol.L<sup>-1</sup> em água deionizada (MiliQ Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) com vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> a 65 °C. O volume de cada amostra foi de 20 µL.

### 2.6.2 Determinação do crescimento celular

O crescimento celular, em biomassa seca, foi monitorado por meio da determinação da densidade ótica em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 600 nm e calculado por meio de uma curva padrão de calibração. As curvas padrão do crescimento microbiano foi calculadas utilizando como base a matéria seca celular por meio de diluições específicas.

### 2.6.3 Determinação da concentração de fenóis

Alíquotas de 5,0 mL de amostras dos hidrolisados foram devidamente diluídas e tiveram seus pH ajustados para 12 com NaOH 6N e a concentração de fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria à 280 nm (Ver item 2.2.3)

### 2.6.4 Análises estatísticas

A análise dos dados de significância estatística foi realizada por meio de uma análise de uma via da variância (ANOVA) a um nível de significância de 95%. Os

dados também foram analisados pelo teste de Tukey utilizando software Microcal Origin 8.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, EUA) a um nível de significância de 95%.

#### 2.6.5 Cálculo do rendimento de xilitol ( $Y_{P1/S1}$ )

O rendimento em xilitol com base no consumo de xilose ( $Y_{P1/S1}$ ) pelos dois micro-organismos avaliados foi calculado por meio da equação 3.5:

$$Y_{P1/S1} = \frac{P_1 - P_0}{S1_0 - S1} \text{ (Equação 3.5)}$$

Sendo:

$Y_{P1/S1}$ : concentração de xilitol por xilose ( $\text{g.g}^{-1}$ )

$P_1$ : concentração de xilitol final ( $\text{g.L}^{-1}$ )

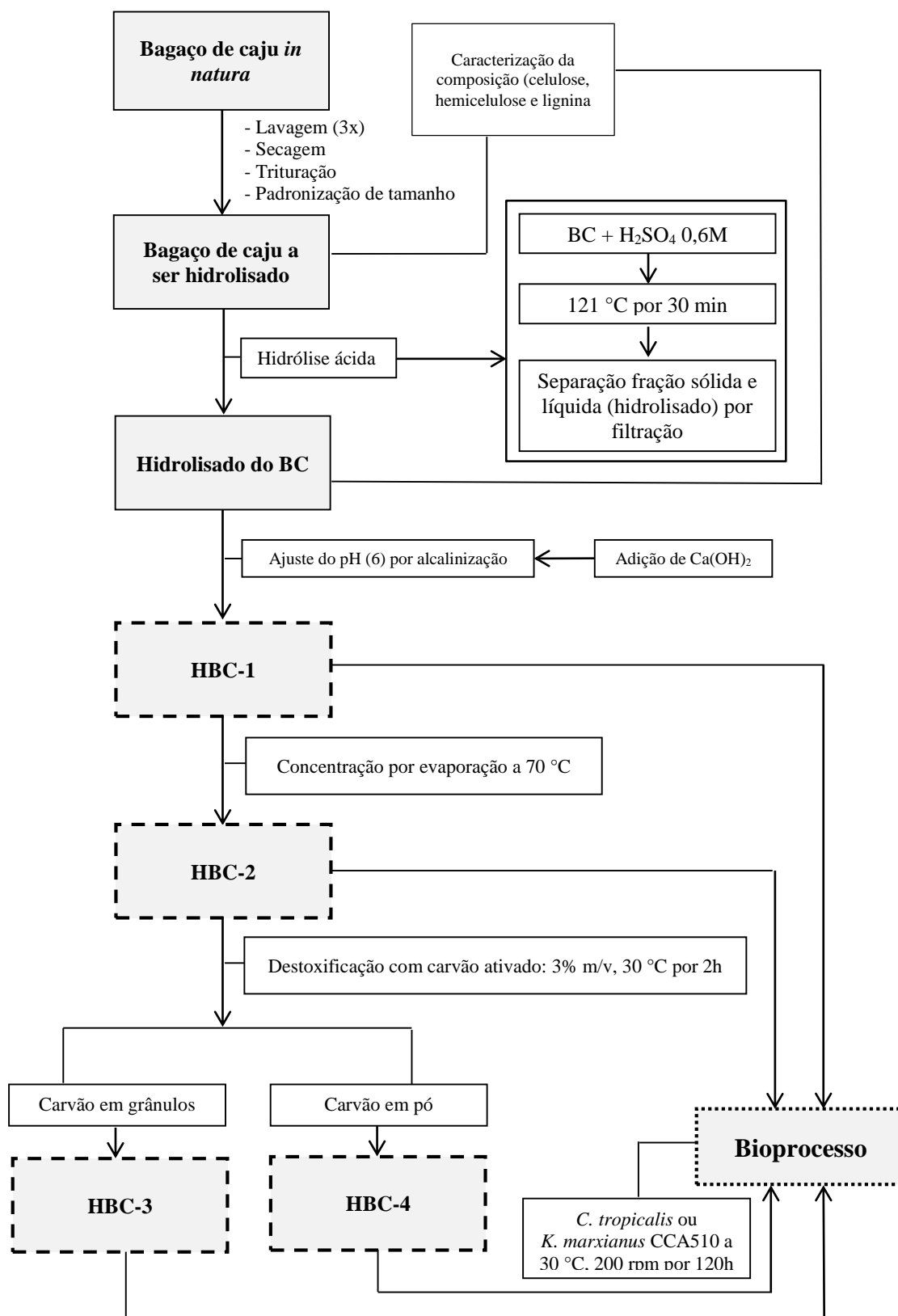
$P_0$ : concentração inicial de xilitol ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$S1_0$ : concentração inicial de xilose ( $\text{g.L}^{-1}$ )

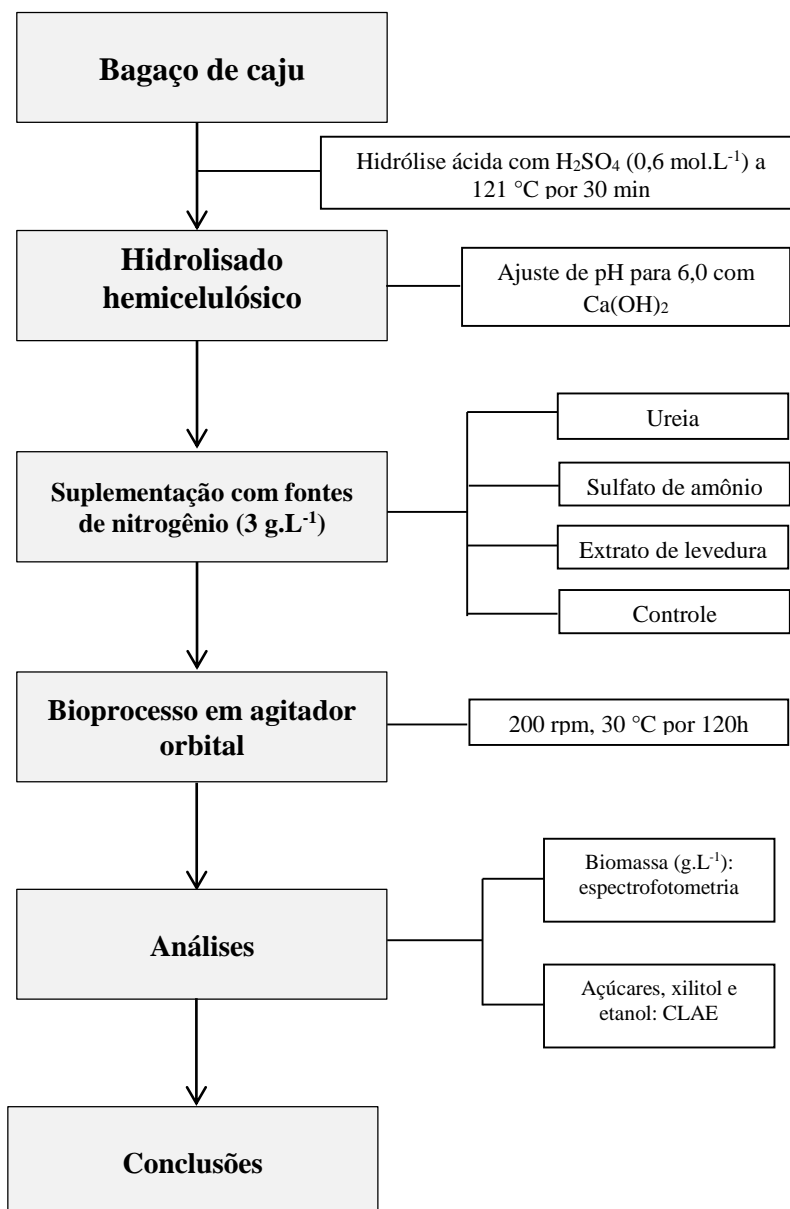
$S1$ : concentração final de xilose ( $\text{g.L}^{-1}$ )



**Figura 3.2:** Fluxograma dos experimentos realizados visando avaliar a influência da destoxificação do HBC na produção de xilitol.



**Figura 3.3:** Fluxograma dos experimentos realizados visando avaliar a influência das fontes de nitrogênio na produção de xilitol por *Candida tropicalis* e por *Kluyveromyces marxianus* CCA510.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização do bagaço

A Tabela 3.2 apresenta os resultados referentes à caracterização do BC “in natura” e do mesmo após sofrer a hidrólise ácida. Pelos dados obtidos observa-se que o BC “in natura” apresentou 17,73% de celulose, 19,22% de hemicelulose, 33,41% de lignina, 6,41% de extraíveis e 1,50 %de cinzas. O BC utilizado possui teor de hemicelulose, fração de onde provem a xilose, inferior ao de outros resíduos citados na literatura. Cheng *et al.* (2009), por exemplo, relatam uma quantidade de 34,32% de hemicelulose na composição de sabugo de milho. Boussarsar, Rogé e Mathlouthi (2009), por sua vez, caracterizaram bagaço de cana de açúcar, encontrado teor de hemicelulose de 26%. Já o bagaço de abacaxi caracterizado por Silva (2011) apresentou 38,18% de hemicelulose em sua constituição. No bagaço tratado com ácido sulfúrico, observou-se uma redução de 76,43% da fração hemicelulósica presente, inviabilizando a reutilização desse material para um novo tratamento visando a liberação de xilose. Para cada grama de hemicelulose pode-se obter 0,88g de xilose, assim como restou aproximadamente 4,53% de hemicelulose no bagaço ácido, apenas 0,0453g de hemicelulose poderia ainda ser convertida a xilose, rendendo em torno de 0,04g de xilose.

**Tabela 3.2:** Composição química percentual (em massa) do bagaço de caju “in natura” e após hidrólise ácida (20% m/v, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6 mol.L<sup>-1</sup>, 121 °C por 30 min).

Componentes da biomassa (%)	Bagaço de caju “in natura”	Bagaço de caju após hidrólise ácida
Celulose	17,73 ± 0,10	19,30 ± 0,09
Hemicelulose	19,22 ± 0,25	4,53 ± 0,05
Lignina	33,41 ± 1,66	54,85 ± 0,12
Extraíveis	6,41 ± 0,23	22,54 ± 0,19
Cinzas	1,50 ± 001	2,30 ± 0,00

Além disso, o teor de lignina no BC aumentou aproximadamente 64 % após a hidrólise ácida com ácido sulfúrico. Esse aumento do teor de lignina no bagaço já tratado com ácido sulfúrico, conseqüentemente, conduziria ao aumento do risco da presença de inibidores fermentativos. Sabe-se que os inibidores derivados da lignina incluem compostos poli aromáticos, fenólicos e aldeídos e que a toxicidade dos inibidores presentes é inversamente proporcional ao seu peso molecular (CHANDEL, SILVA e SINGH, 2012). Os fenólicos com menor peso molecular são mais letais aos micro-organismos que aqueles com maior peso molecular. Esses inibidores desregulam as membranas celulares, danificando sua habilidade de atuar como barreiras seletivas e matrizes de enzimas, afetando o crescimento celular e assimilação de açúcares (HEIPIEPER *et al.*, 1994; CHANDEL, SILVA e SINGH, 2012).

Com a hidrólise ácida foi possível liberar xilose ( $19,02 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$ ), glicose ( $12,09 \pm 0,35 \text{ g.L}^{-1}$ ) e arabinose ( $11,28 \pm 0,16 \text{ g.L}^{-1}$ ) a partir da hemicelulose e celulose presentes no BC, disponibilizando esses carboidratos para assimilação microbiana e, conseqüente, produção de xilitol. Por outro lado, compostos inibidores também foram formados durante a hidrólise ácida, dificultando a fermentação do HBC. Esse compostos, mostrados na Tabela 3.4, incluem ácido acético ( $1,79 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ ), ácido fórmico ( $0,08 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$ ) e fenóis ( $8,53 \pm 0,36 \text{ g.L}^{-1}$ ). A concentração total de açúcares fermentescíveis obtida por meio da hidrólise ácida, incluindo glicose, xilose e arabinose, foi de aproximadamente  $42,39 \text{ g.L}^{-1}$ , o que faz do HBC um meio com quantidade favorável ao crescimento microbiano em relação as fontes de carbono presentes. Observando-se a literatura, salienta-se que a hidrólise ácida realizada foi um tratamento eficiente na obtenção dos açúcares de interesse. Alguns autores, realizando tratamento semelhante, obtiveram resultados inferiores ao hidrolisar materiais lignocelulósicos diversos. Mateo *et al.* (2013) obtiveram aproximadamente  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose, glicose e arabinose a partir de resíduos de poda de oliveira. Branco, Santos e Silva (2011), por sua vez, hidrolisaram bagaço de cana de açúcar e obtiveram  $28,5 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares fermentescíveis. Castro *et al.* (2013), hidrolisando lascas de madeira de eucalipto com utilização de ácido sulfúrico, obtiveram  $8,1 \text{ g.L}^{-1}$  de carboidratos (glicose, xilose e arabinose). Os hidrolisados hemicelulósicos podem fornecer grandes quantidades de açúcares fermentescíveis (Tabela 3.3), mas os valores obtidos dependem do tipo de hidrolisado, bem como do tratamento utilizado para liberação dos açúcares.

**Tabela 3.3:** Composição de hidrolisados hemicelulósicos expressados em concentração de açúcares

Resíduo	Composição (g.L <sup>-1</sup> )			Referência
	Xilose	Glicose	Arabinose	
Bagaço de abacaxi	27,6	29,9	5,48	Silva, 2011
Bagaço de caju	19,02	12,09	11,28	Presente trabalho
Bagaço de cana de açúcar	18,0	6,0	4,5	Branco, Santos e Silva, 2011
Casca de café	46,4	28,0	-	Fonseca <i>et al.</i> , 2011
Madeira de eucalipto	7,4	0,3	0,4	Castro <i>et al.</i> , 2013
Palha de arroz	25,9	4,5	4,3	Huang <i>et al.</i> , 2011
Palha de cana de açúcar	46,8	9,2	-	Fonseca <i>et al.</i> , 2011
Palha de milho	35,2	2,4	-	Fonseca <i>et al.</i> , 2011
Podas de oliveira	2,7	5,8	3,5	Mateo <i>et al.</i> , 2013
Resíduos hortícolas	36,5	8,5	2,9	Zhang <i>et al.</i> , 2012
Sabugo de milho	20,9	3,4	2,1	Misra, Raghuwanshi e Saxena, 2013
Sabugo de milho	21,7	2,8	1,2	Ping <i>et al.</i> , 2013
Sabugo de milho	31,3	3,3	3,9	Li <i>et al.</i> , 2012
Serragem de madeira	18,5	4,2	-	Rafiqul e Sakinah, 2012

Após ajuste de pH com  $\text{Ca(OH)}_2$  observou-se uma pequena diminuição da quantidade total de açúcares (passando de 42,39 para 42,01  $\text{g.L}^{-1}$ ), o que não é significativo para o processo. No que diz respeito à xilose, ocorreu uma redução de apenas 0,43  $\text{g.L}^{-1}$  após o ajuste do pH. Essa pequena redução de açúcares presentes no hidrolisado de BC é um ponto positivo para se estabelecer um processo visando a destoxificação do meio com carvão ativado, já que alguns autores (MARTON, 2002; VILLARREAL, 2005) afirmam que a metodologia de adsorção por carvão ativo durante o tratamento de hidrolisados apesar de propiciar a remoção de compostos tóxicos e clarificação dos hidrolisados pode, em alguns casos, apresentar o inconveniente da perda de açúcares. Contudo, ainda é o método mais utilizado para remoção de compostos tóxicos em hidrolisados hemicelulósicos.

É importante destacar que a alcalinização do HBC, que ocorre durante o ajuste do pH, já é considerado um método de destoxificação. De acordo com Parajó, Dominguez e Dominguez (1998) o método de destoxificação por tratamento químico com  $\text{Ca(OH)}_2$  ou  $\text{CaO}$ , consiste em adicionar álcali ao hidrolisado bruto, aumentando seu pH acima de 10, em condições controladas de temperatura e tempo de reação, é conhecido por *overliming* (alcalinização). No final do processo, o pH da mistura é ajustado ao valor de cultivo do microrganismo com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e o precipitado formado é removido por filtração ou centrifugação. As vantagens desse método são: baixo custo, remoção parcial de ácido acético e compostos fenólicos, precipitação de íons metálicos tóxicos de Fe, Ni, Cr, e conversão de furfural a compostos menos tóxicos (como ácido furfurílico), metabolizável pelo microrganismo da fermentação. Como desvantagens encontram-se perdas de açúcares do hidrolisado causadas por conversão a compostos tóxicos (ácido láctico), por arraste na precipitação do sal e problemas de incrustações dos sais de cálcio formados nos equipamentos de separação, fermentação e purificação (PARAJÓ, DOMINGUEZ e DOMINGUEZ *et al.*, 1998).

Apesar do ajuste do pH utilizando  $\text{Ca(OH)}_2$  não ter alterado a concentração de ácido acético e ácido fórmico, proporcionou a redução dos fenóis em 61,3%, o que é de extrema importância ao processo, visto que a literatura mostra que compostos fenólicos, como vanilina e siringaldeído (CORTEZ e ROBERTO, 2010), podem ser os componentes muito tóxicos ao crescimento microbiano, podendo atuar nas membranas biológicas, impedindo o crescimento (HEIPIEPER *et al.*, 1994).

**Tabela 3.4:** Composição dos meios formulados a partir de hidrolisado do bagaço de caju

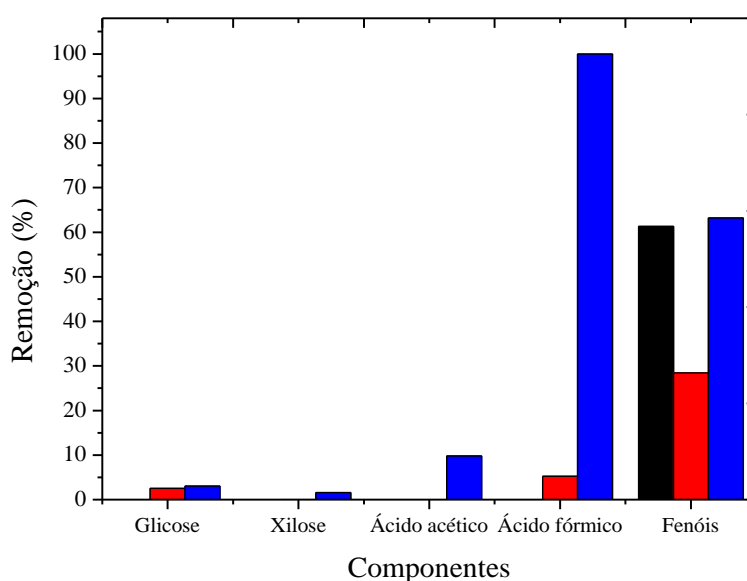
Composição (g.L <sup>-1</sup> )	Concentração				
	Hidrolisado após hidrólise ácida	(HBC-1)	(HBC-2)	(HBC-3)	(HBC-4)
Glicose	12,09 ± 0,35	12, 57 ± 0,25	30,64 ± 0,02	29,87 ± 0,14	29,71 ± 0,25
Xilose	19,02 ± 0,07	18,59 ± 0,04	36,44 ± 0,16	36,43 ± 0,56	35,86 ± 0,22
Arabinose	11,28 ± 0,16	10,85 ± 0,19	32,23 ± 0,09	32,42 ± 0,93	30,96 ± 0,12
Ácido acético	1,79 ± 0,01	1,89 ± 0,08	4,50 ± 0,09	4,64 ± 0,06	4,06 ± 0,03
Ácido fórmico	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,38 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,00 ± 0,00
Furfural	n.d.	n.d.	n.d	n.d	n.d
5-HMF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fenóis	8,53 ± 0,36	3,30 ± 0,07	3,34 ± 0,08	2,39 ± 0,01	1,23 ± 0,11

\*n.d.: não detectado

\*\*HBC-1:hidrolisado não concentrado após ajuste do pH, HBC-2: hidrolisado concentrado sem tratamento, HBC-3: hidrolisado concentrado tratado com carvão ativado em grânulos e HBC-4:hidrolisado concentrado tratado com carvão ativado em pó.

Com a concentração realizada no hidrolisado (HBC-2), aumentou-se, aproximadamente, 2,5 vezes o teor de glicose e 2,0 vezes a concentração de xilose. Contudo, a concentração dos interferentes ácido acético e ácido fórmico aumentou em torno de 2,4 vezes e 4,8 vezes, respectivamente (Tabela 3.4). Esse fato está de acordo com citados na literatura por outros autores. Arruda *et al.* (2011), por exemplo, concentraram hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar por rotaevaporação e, durante esse processo, a concentração de ácido acético passou de 2,3 para 5,3 g.L<sup>-1</sup>. Analisando-se a Figura 3.4 pode-se observar a remoção dos açúcares e compostos tóxicos presentes no HBC em diferentes tratamentos de destoxificação, ressaltando-se que a perda de glicose e xilose foi muito pequena comparada a quantidade de fenóis removida quando se utilizou os tratamentos com carvão ativado. Castro *et al.* (2013) também concentraram por rotaevaporação hidrolisado de bagaço de cana de açúcar visando aumentar a quantidade de açúcares fermentescíveis, contudo a concentração de ácido acético, que inicialmente era de 2,8 g.L<sup>-1</sup>, atingiu 6,4 g.L<sup>-1</sup>, ou seja, 2,3 vezes. Esses últimos autores constataram ainda que após a evaporação do hidrolisado a concentração de furfural e 5-HMF foi reduzida em 71,4 e 7,76%, respectivamente. Destaca-se que não se detectou no HBC obtido no presente estudo concentrações de furfural ou 5-HMF e, em relação aos fenóis observou-se uma grande redução já após o ajuste do pH com Ca(OH)<sub>2</sub>, indo de 8,53 a 3,30 g.L<sup>-1</sup>, o que corresponde a 38,7

**Figura 3.4:** Remoção dos açúcares e compostos tóxicos presentes no HBC em diferentes tratamentos de destoxificação: HBC-2 (■), HBC-3 (■) e HBC-4 (■).



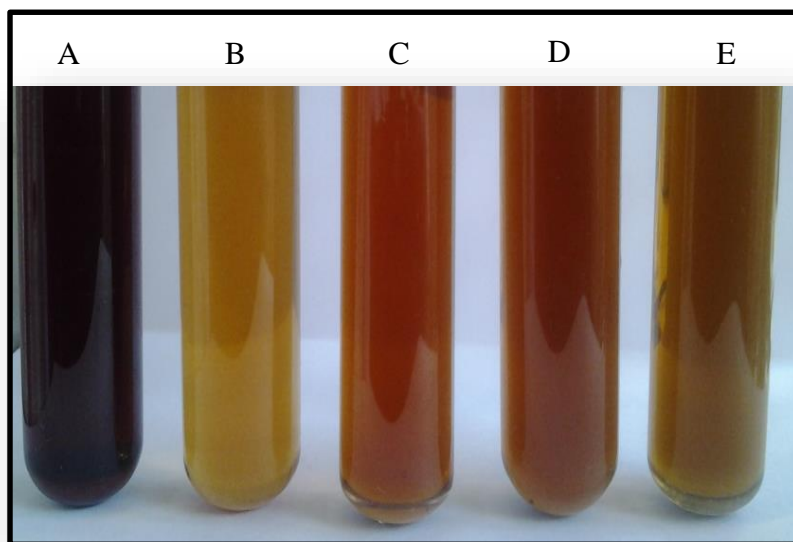


Ao se atentar para os resultados do HBC-3, que foi destoxificado com carvão ativado com a maior granulometria, percebe-se que o mesmo não foi efetivo tanto na eliminação de ácido acético quanto na de ácido fórmico, que se mantiveram nas concentrações de 4,64 e 0,36 g.L<sup>-1</sup>. Já para o HBC-4, que foi submetido ao tratamento com carvão em pó, observou-se a eliminação completa de ácido fórmico e leve redução de ácido acético (11,11%) (Figura 3.4). Altos níveis de ácidos orgânicos fracos conduzem a acidificação do citoplasma da levedura e essa acidificação citoplasmática esgota a reserva de ATP por meio de um desvio de ATP para ATPases da membrana plasmática, que bombeiam íons H<sup>+</sup> para o exterior celular buscando regular o pH intracelular (ALMEIDA *et al.*, 2007). É sabido, por exemplo, que ácido acético e ácido fórmico são relatados por inibir o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, em concentrações de 1,6 e 1,4 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. (ALMEIDA *et al.*, 2007). Cheng *et al.* (2009) estudaram a otimização do pH e da concentração de ácido acético para a bioconversão de hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho em xilitol por *Candida tropicalis*. Esses autores testaram diversas concentrações de ácido acético no meio fermentativo e notaram que a sua presença a partir de 2 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético inibiu a produção de xilitol reduzindo-a em cerca de 9% a produção. No presente trabalho, observa-se que a concentração de ácido acético no HBC-1 foi inferior a concentração inibitória citada por esses autores. Em contra partida, a presença de ácido acético abaixo de 1 g.L<sup>-1</sup> favoreceu a produção de xilitol por uma linhagem de *C. guilliermondii*, mas acima de 3 g.L<sup>-1</sup> atuou como um composto inibitório (SILVA *et al.*, 2004). Castro *et al.* (2013) também avaliaram a produção de xilitol por uma cepa de *C. guilliermondii* e notaram que ela foi capaz de metabolizar 62% do ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, o que correspondeu a uma concentração de 5 g.L<sup>-1</sup> do ácido.

A redução dos compostos fenólicos, que podem incluir fenol, vanilina, ácido vanílico, ácido cumárico e seringaldeído (RODRIGUES, KENEALY e JEFFRIES, 2011), observada no tratamento com os dois tipos de carvão utilizados, contudo a redução desses compostos no HBC-4 foi de 63,2%, enquanto no HBC-3 foi de 28,3%, portanto a utilização do carvão com menor granulometria teve maior eficiência. Esse fato é explicado provavelmente devido a maior área de superfície de contato proporcionada nesse carvão. Na Figura 3.5 pode visualizar nitidamente a mudança de

coloração nos hidrolisados. Em (D) pode-se perceber uma coloração levemente mais escura que em (E), que é justificável pela maior concentração de fenóis presentes.

**Figura 3.5:** Aspectos dos hidrolisados: (A) Hidrolisado de bagaço de caju sem ajuste de pH, (B) Hidrolisado de bagaço de caju com pH ajustado com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , (C) Hidrolisado bagaço de caju concentrado, (D) Hidrolisado bagaço de caju concentrado e tratado com carvão ativado em grânulos e (E) Hidrolisado bagaço de caju concentrado e tratado com carvão em pó.



Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar obtido por Arruda *et al.* (2011) apresentou um total de  $5,48 \text{ g.L}^{-1}$  de compostos fenólicos, concentração superior a obtida no HBC-2 ( $3,3 \text{ g.L}^{-1}$ ), porém o tratamento de destoxificação utilizado por esses pesquisadores reduziu em cerca de 93% desses compostos. Villa *et al.* (1998) estudaram o efeito tóxico do fenol durante crescimento de *C. guilliermondii* em meio semissintético, constatando que a presença de baixa concentração ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) deste composto foi capaz de reduzir consideravelmente a produtividade de xilitol. De acordo com esses autores, isto se deve provavelmente à inibição da atividade da xilose redutase (XR) ou transporte de xilose através da membrana plasmática, já que a assimilação de xilose foi também drasticamente diminuída.

Cortez e Roberto (2010) estudaram a otimização da produção de xilitol por *C. guilliermondi* em meio contendo aldeídos fenólicos (vanilina e seringaldeído) por meio de Metodologia de Superfície de Resposta (MRS) variando a concentração desses compostos em  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  e  $2 \text{ g.L}^{-1}$ . Concluíram que a bioconversão de xilose a xilitol pela levedura utilizada é fortemente dependente da combinação de aldeídos e fenóis no meio

de fermentação e até 2 g.L<sup>-1</sup> foi possível observar a conversão de xilose a xilitol. Afirmam ainda que a vanilina é uma fonte de composto fenólico capaz de melhorar a produção de xilitol por leveduras e a conversão de vanilina em álcool vanilil notada revela o potencial da levedura para a destoxificação do meio.

Prakash *et al.* (2011) observaram que a utilização de carvão ativado para o tratamento de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar na concentração de 1 %, 28 °C e 50 rpm por 4h, foi capaz de reduzir substancialmente a concentração de ácido acético e compostos fenólicos derivados da solubilização da lignina. A redução de fenóis é um ponto crítico para a fermentação microbiana visando à produção de fenóis, visto que é tóxico há muitos micro-organismos. Mussatto (2002) estudou o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e verificou maior remoção de compostos fenólicos em pH 2,0 concluindo, estatisticamente, que o pH é a variável de maior influência nos processos de adsorção com carvão ativado. Marton (2002) avaliou a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar a partir da utilização de quatro marcas nacionais de carvão ativo pulverizado (Synth, Brasilac, Carbomafra e Carvorite) e não encontrou diferenças significativas entre os carvões quanto à produtividade volumétrica de xilitol. De acordo com esse autor, as condições de adsorção influenciaram no tratamento e nos parâmetros do processo, notando-se maior remoção de tóxicos (44,18% do ácido acético, 76,22% dos compostos fenólicos, 58,27% do furfural e 59,69% de 5-HMF) e melhor clarificação do hidrolisado quando empregou temperatura de 60° C, tempo de contato de 30 min, agitação de 200 rpm, pH 2,5 e 1% m/v de carvão ativado. Nestas condições *C. guilliermondii* consumiu 94,14% de xilose resultando em fator de conversão de 0,66 g.g<sup>-1</sup> e produtividade de 0,51 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de xilitol, valores próximos aos obtidos no presente estudo.

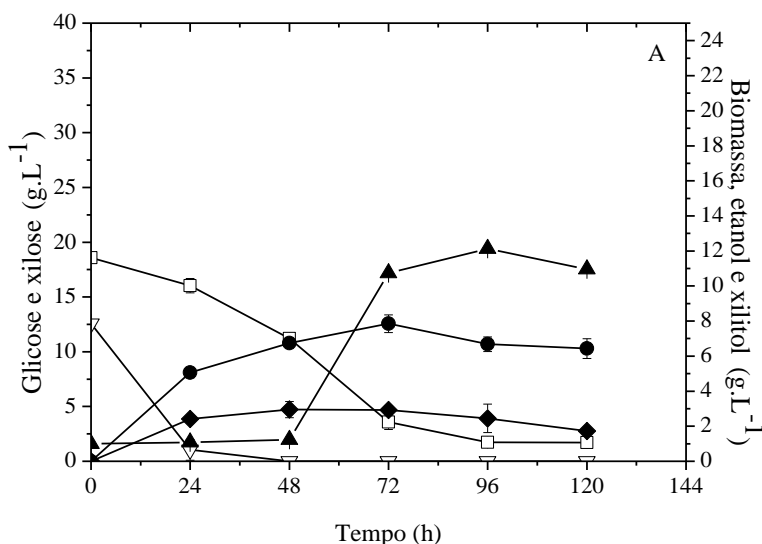
Segundo Mateo *et al.* (2013) o processo de destoxificação mais adequado para melhorar a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos depende da natureza do mesmo, sendo o método ideal aquele que elimine a maior quantidade de compostos tóxicos e ocasione o mínimo de perdas dos açúcares fermentescíveis presentes. No entanto, para que haja uma fermentação eficaz, uma vez avaliados os parâmetros do processo, pode-se definir se é necessária uma redução total ou apenas parcial dos compostos sem que se tenha uma repercussão negativa sobre o metabolismo celular das leveduras. Esses autores concluíram em suas pesquisas sobre destoxificação no

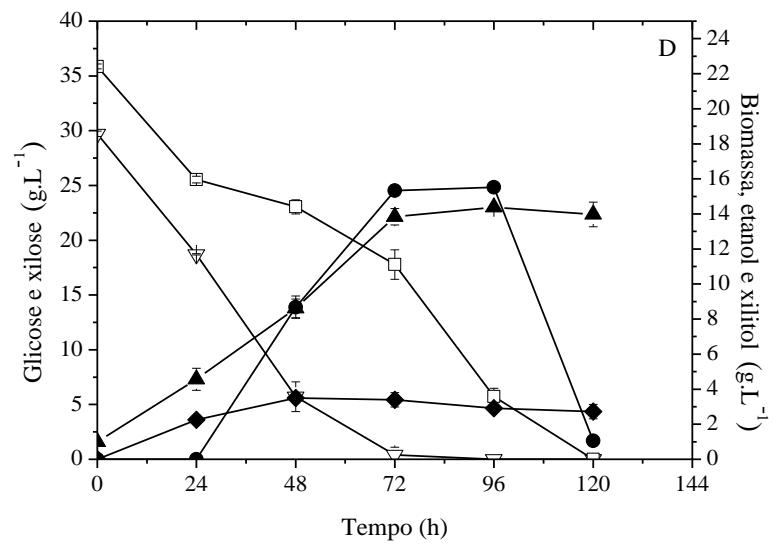
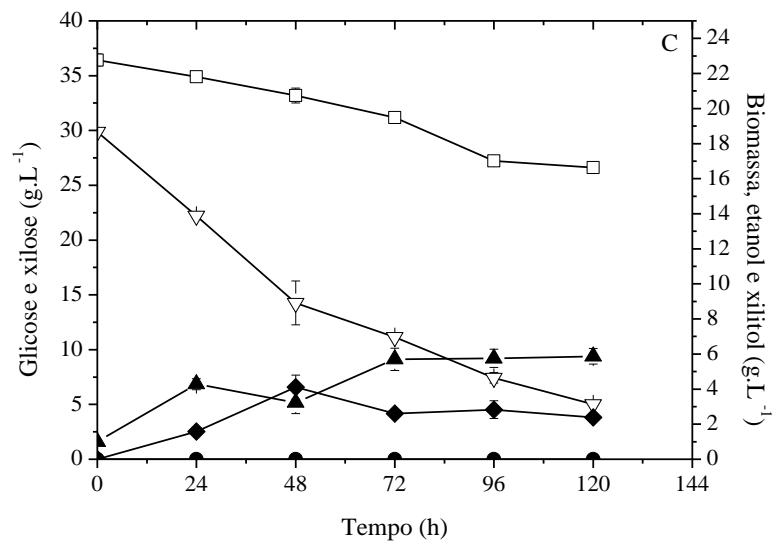
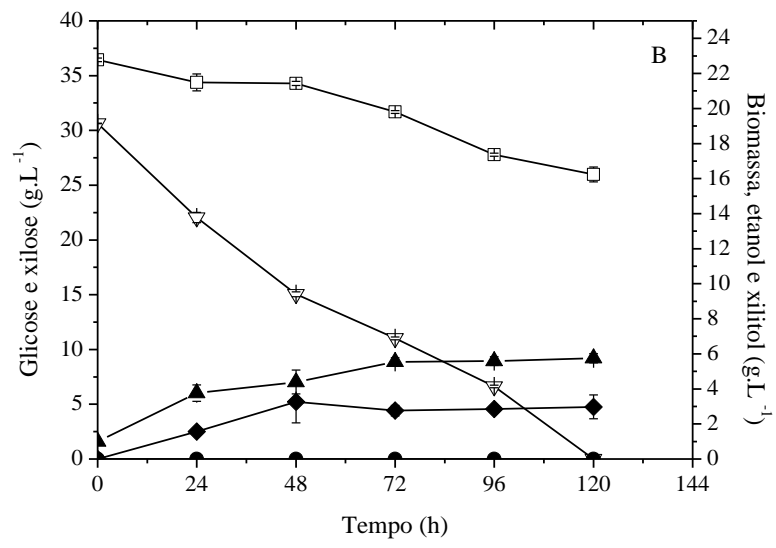
hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira que o uso de carvão ativado pode ser uma excelente alternativa para diminuir compostos inibitórios no hidrolisado (46% de ácido acético, 81% de compostos fenólicos e 98% de furanos totais), ainda existindo a possibilidade de redução de custos pela reutilização do carvão. As condições ideais encontradas para a otimização desses compostos, nesse caso, foram adsorção com 2% de carvão ativado a 30 °C, 200 rpm e pH 2.

### 3.2 Influência da destoxificação com carvão ativado na fermentação do hidrolisado de bagaço de caju

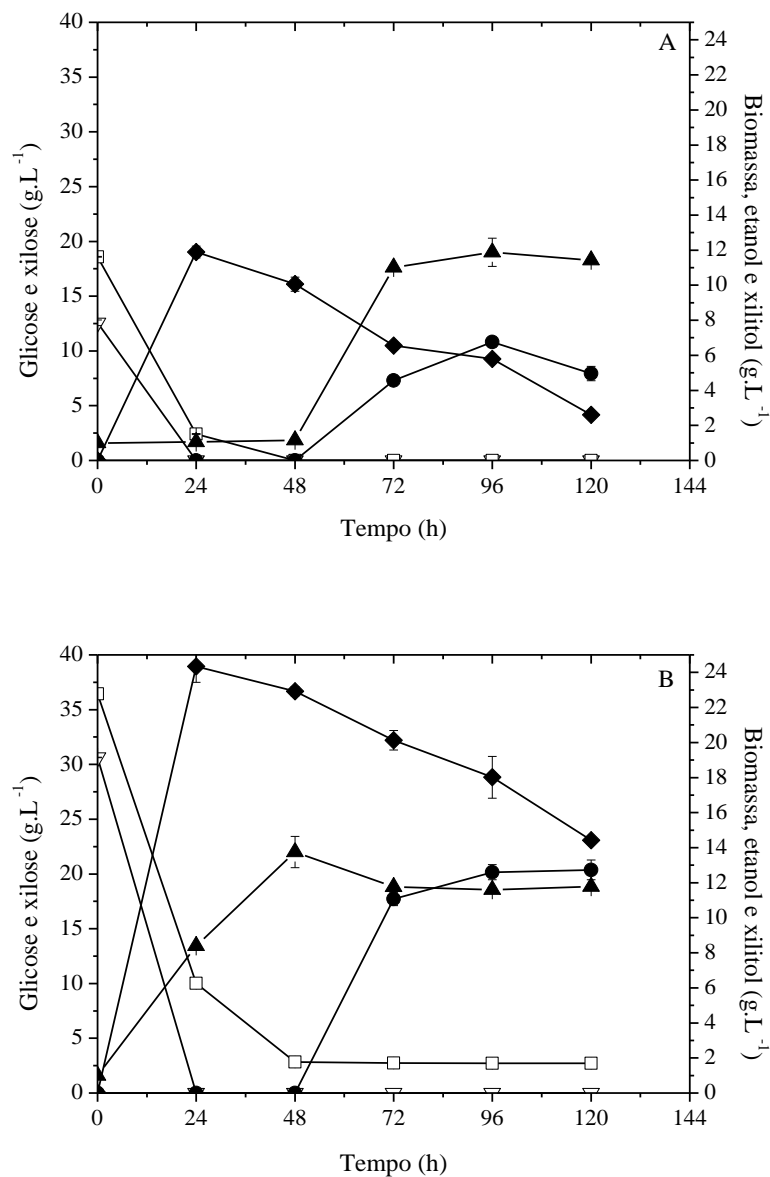
Avaliou-se a capacidade de *Candida tropicalis* (Figura 3.6) e *Kluyveromyces marxianus* CCA510 (Figura 3.7) em produzirem xilitol no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju sob diferentes tratamentos (Tabela 3.1) visando definir o melhor processo para produção de xilitol a partir do HBC.

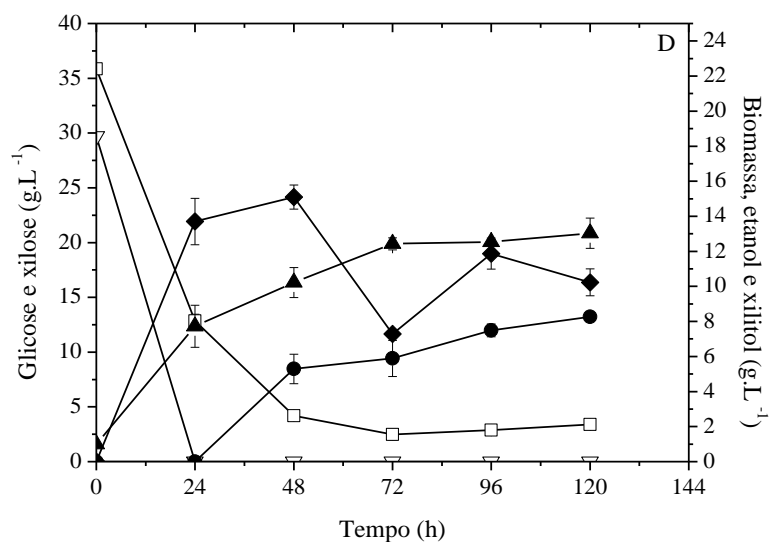
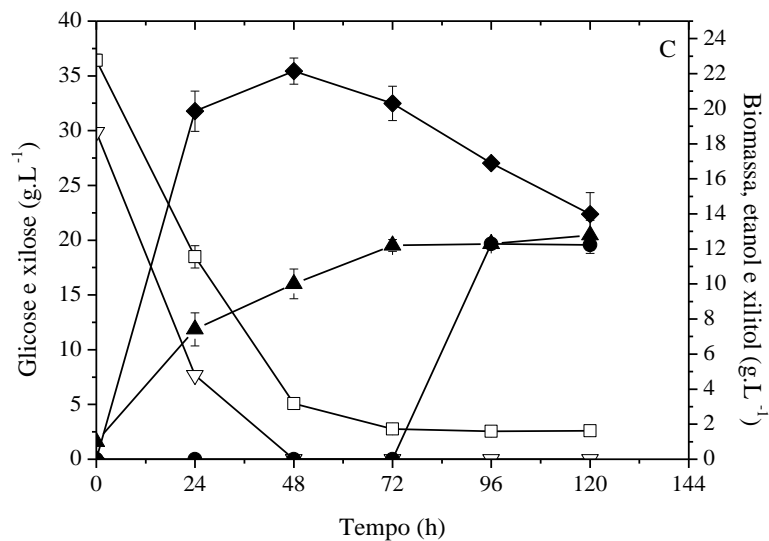
**Figura 3.6:** Cultivo com *Candida tropicalis*, de meios formulados por HBC com diferentes tratamentos: (A) meio não concentrado (HBC-1), (B) meio concentrado e sem tratamento (HBC-2), (C) meio concentrado com carvão (grânulos) (HBC-3) e (D) meio concentrado com carvão (pó) (HBC-4). Biomassa (▲), etanol (◆), xilitol (●), glicose (▽) e xilose (□): 200 rpm a 30 °C por 120h.





**Figura 3.7:** Fermentação, por *Kluyveromyces marxianus* CCA 510, de meios formados por HBC com diferentes tratamentos: (A) meio não concentrado, (B) meio concentrado e sem tratamento, (C) meio concentrado com carvão (grânulos) e (D) meio concentrado com carvão (pó). Biomassa (▲), etanol (◆), xilitol (●), glicose (▽) e xilose (□): 200 rpm a 30 °C por 120h.





Quanto ao crescimento em biomassa, observa-se que a maior concentração atingida por *K. marxianus* CCA510 (13,75 g.L<sup>-1</sup>) foi no meio HBC-2, que possuía maior concentração de glicose e xilose, uma vez que foi concentrado, porém não sofreu tratamento de destoxificação. Ou seja, esse micro-organismo conseguiu crescer em concentrações elevadas dos inibidores presentes. No meio HBC-1 o crescimento desse micro-organismo foi de 11,88 g.L<sup>-1</sup>. Atentando para o crescimento de *C. tropicalis*, percebe-se que foi maior no meio HBC-4 (14,38 g.L<sup>-1</sup>) e menor em HBC-2 (5,87 g.L<sup>-1</sup>), evidenciando que esse micro-organismo teve maior dificuldade em crescer em meio

com maior concentração de interferentes, principalmente fenóis. No meio com menor concentração de glicose e xilose, HBC-1, *C. tropicalis* teve crescimento similar a *K. marxianus* no mesmo meio. A variação do crescimento pelas cepas microbianas avaliadas pode estar relacionado com a facilidade destas assimilarem os açúcares presentes no hidrolisado.

*K. marxianus* CCA510 consumiu 100% da xilose presente nos hidrolisados durante a fermentação apenas no meio HBC-1, destacando que em 24h já havia sido consumida aproximadamente 90% da xilose que constituía esse meio. Contudo, nos demais meios esse micro-organismo foi capaz de assimilar em média 95% de xilose, mesmo em presença de glicose. Todavia o consumo de xilose foi acelerado ao passo que a glicose foi consumida, indicando maior facilidade da assimilação de glicose em relação a xilose por esse micro-organismo. *C. tropicalis* consumiu 100% da xilose no meio HBC-4, fato que vai de encontro ao seu maior crescimento em biomassa, também nesse meio. Na presença de glicose, a qual só foi consumida em até 24h no meio HBC-1, essa linhagem assimilou lentamente a xilose, evidenciando que aquele carboidrato reprimiu o metabolismo desse em detrimento da produção de etanol.

A produção de xilitol alcançada por *K. marxianus* CCA510 foi máxima no meio HBC-2 (concentrado porém não submetido a destoxificação), atingindo 12,73 g.L<sup>-1</sup>. A seguir foi mais expressiva no meio HBC-4, 12,29 g.L<sup>-1</sup>, tratado com carvão de menor granulometria. No meio que não teve sua concentração de xilose concentrada, HBC-1, a concentração de xilitol foi de 6,76 g.L<sup>-1</sup>. Contudo tomando-se o rendimento em xilitol ( $Y_{PI/SI}$ ), que é calculada em relação à quantidade inicial de xilose presente no meio de fermentação, percebe-se que no meio HBC-1 ( $Y_{PI/SI} = 0,363 \text{ g.g}^{-1}$ ) foi próxima a HBC-4 ( $Y_{PI/SI} = 0,362 \text{ g.g}^{-1}$ ), ou seja, para *K. marxianus* CCA510, a concentração do hidrolisado e o tratamento com carvão ativado não demonstrou relevância para melhoria na produção de xilitol (Tabela 3.5). Destaca-se, ainda, que em nenhum dos meios essa levedura foi capaz de produzir o poliol em menos de 24h de fermentação, fase em que possivelmente ainda estavam em fase de adaptação.

A linhagem de *C. tropicalis* apresentou comportamento diferente de *K. marxianus* CCA510 na produção de xilitol. A produção de xilitol só foi observada no meio HBC-1 (7,85 g.L<sup>-1</sup>) e no meio HBC-4 (15,52 g.L<sup>-1</sup>) (meios nos quais a concentração de inibidores foi reduzida), evidenciando maior sensibilidade desse micro-



organismo quanto à presença de compostos inibidores. Em HBC-1 apresentou  $Y_{PI/SI} = 0,523 \text{ g.g}^{-1}$  e em HBC-4  $Y_{PI/SI} = 0,847 \text{ g.g}^{-1}$ , valores que também não mostram a necessidade da concentração do hidrolisado para obter maiores rendimentos de xilitol (Tabela 3.5).

**Tabela 3.5:** Rendimentos de xilitol por *K. marxianus* CCA510 e *Candida tropicalis* no hidrolisado (HBC) submetido a diferentes tratamentos

	<i>Candida tropicalis</i>				<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCA 510			
	HBC-1	HBC-2	HBC-3	HBC-4	HBC-1	HBC-2	HBC-3	HBC-4
$Y_{PI/SI}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,523	0,000	0,000	0,847	0,363	0,328	0,569	0,362
$Q_{PI}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )*	0,109	0,000	0,000	0,162	0,070	0,106	0,128	0,069
$P_I^{max}$ (g.L <sup>-1</sup> )*	7,85	0,00	0,00	15,52	6,76	12,73	8,26	12,23

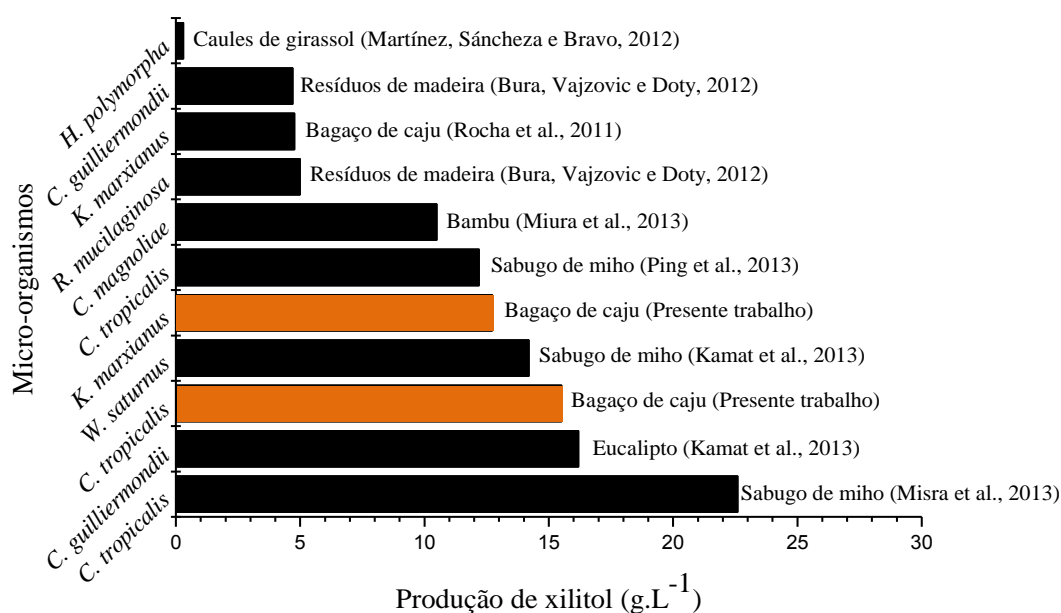
\*Tempo total de bioprocesso:120h

Para a produção de xilitol utilizando hidrolisados hemicelulósicos, o processo é afetado pela concentração dos açúcares no meio de fermentação e pelas proporções nas quais eles ocorrem, bem como dos compostos tóxicos liberados durante a hidrólise hemicelulósica. Por exemplo, altas concentrações de açúcares monoméricos podem ocasionar estresse osmótico ou levar a uma produção de etanol em concentrações intoleráveis pela levedura (WALTHER, HENSIRISAK e AGBLEVOR, 2001). *C. tropicalis* ATCC 96745 foi cultivada em meio contendo 60 g.L<sup>-1</sup> de xilose diferentes razões de glicose e constatou-se que a glicose inibiu fortemente a formação de xilitol em todos os níveis. Baixas concentrações iniciais de glicose (10-20 g.L<sup>-1</sup>) não demonstraram nenhum efeito na produção de xilitol, porém acima de 20 g.L<sup>-1</sup> a produção de xilitol foi consideravelmente reduzida (WALTHER, HENSIRISAK e AGBLEVOR, 2001). Wang *et al.* (2013) estudaram a melhoria do processo de assimilação de xilose por *K. marxianus* YRL005, uma cepa modificada geneticamente. Os autores notaram que a glicose foi consumida primeiro e mais rapidamente que a xilose, mostrando que esse micro-organismo possui genes que coordenam a metabolização da xilose, mas que podem ser reprimidos pela presença de glicose, embora não seja um mecanismo completamente esclarecido. Comportamento similar foi

observado no presente estudo, em que os micro-organismos consumiram rapidamente a glicose presente no meio em preferência a xilose, o que adia a produção de xilitol.

A produção biotecnológica de xilitol a partir de matérias lignocelulósicas vem sendo bastante investigada na literatura na última década, visto a importância do aproveitamento desses resíduos e a possibilidade de produção de produtos com valor agregado. Diversos valores são encontrados na literatura para a produção de xilitol a partir desses resíduos (ROCHA *et al.*, 2011; KAMAT *et al.*; MIURA *et al.*, 2013). A Figura 3.8 compara os resultados obtidos na produção de xilitol em batelada a partir de HBC com outros resíduos, ressaltando-se que a composição hemicelulose de cada resíduo é diversa, podendo dar origem a concentrações diferenciadas de açúcares fermentescíveis.

**Figura 3.8:** Produção de xilitol obtida a partir de diversos resíduos hemicelulósicos, incluindo bagaço de caju do presente estudo.



Produção de etanol também foi observada pelas duas leveduras em questão, porém, consideravelmente superior quando se utilizou a cepa de *K. marxianus* CCA510 no meio HBC-2 (24,34 g.L<sup>-1</sup>), o que mostra que a remoção de interferentes não foi um parâmetro crucial nesse processo. Já *C. tropicalis* produziu cerca de 6 vezes menos, atingindo um máximo de 4,11 g.L<sup>-1</sup> no meio HBC-3. A mais baixa produção de etanol observada para as duas leveduras foi no meio contendo menor quantidade de glicose,

HBC-1, sendo a produção de *K. marxianus* CCA510 (Figura 3.6) e *C. tropicalis* (Figura 3.7) nesse meio 11,89 e 2,92 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Walther, Hensirisak e Agblevor (2001) observaram em seus experimentos que etanol foi produzido, em todas as fermentações conduzidas, como subproduto na produção de xilitol a partir de meio contendo açúcares hemicelulósicos. Além disso, a produção de etanol aumentou à medida que se incrementou a concentração de glicose no meio, fato similar ao observado com a levedura *K. marxianus* CCA510 no presente estudo. Assim como na pesquisa realizada por esses autores, conclui-se que, mesmo na presença de etanol, ambos micro-organismos estudados mostraram ser capazes de assimilar a xilose presente no HBC e produzir xilitol. Contudo, deve-se destacar que a produção do polioli só teve maior acréscimo quando se estacionou a produção de etanol, o que corresponde ao esgotamento da glicose no hidrolisado. A produção conjunta de etanol e xilitol também foi observada por diversos outros autores (KUMAR *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011; BURA, VAJZOVIC e DOTY, 2012; CASTRO *et al.*, 2013) e, na maioria dos estudos, as taxas para produção de etanol são superiores as da produção de xilitol, fato explicado pela maior facilidade de assimilação de glicose pelos micro-organismos utilizados nos experimentos. No caso de *C. tropicalis*, avaliada no presente estudo, observou-se um comportamento contrário a isso, uma vez que a produção de etanol foi inferior. Adicionalmente, a produção desses dois bioprodutos de forma integrada possui elevado potencial tecnológico, sendo ainda necessário se estabelecer um processo capaz de proporcionar essa produção em escalas ampliadas.

Diante do avaliado em relação ao tipo de hidrolisado de bagaço de caju utilizado para produção de xilitol, observa-se variação em relação aos micro-organismos, já que *Kluyveromyces. marxianus* CCA510 foi capaz de produzir o polioli mesmo na presença de inibidores. Já a linhagem de *Candida tropicalis* se mostrou mais sensível aos interferentes presentes. Por sua vez, a destoxificação com carvão ativado em pó (HBC-4) mostrou-se mais eficiente para a redução de inibidores, sendo a sua utilização mais promissora.

### 3.3 Influência da suplementação do hidrolisado de bagaço de caju com diferentes fontes de nitrogênio

Sabe-se que é necessário suplementar o meio de cultivo com fatores nutricionais, como o extrato de levedura, sulfato de amônio, ureia, dentre outros. Para algumas leveduras, o extrato de levedura é um importante nutriente para produção de xilitol. Para outras, entretanto, ele não tem efeito significativo, sendo o crescimento dessas leveduras favorecido pela utilização de amônia ou ureia e casaminoácidos como fonte de nitrogênio (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA,1998). Assim, buscou-se investigar a utilização dessas fontes de nitrogênio para a produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju.

O hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju utilizado para os testes que avaliaram a influência das fontes de nitrogênio (HBC-2) na produção de xilitol possuía concentração de glicose e xilose de 31,82 g.L<sup>-1</sup> e de 30,10 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, o que somando-se confere um valor acima de 60 g.L<sup>-1</sup> de carboidratos disponíveis para assimilação pelos micro-organismos avaliados. A caracterização do hidrolisado foi realizada de acordo com o descrito no item 2.3 (métodos analíticos)

A produção de biomassa por *K. marxianus* CCA510, ou seja, o crescimento celular microbiano, foi maior no meio contendo extrato de levedura (12,93 g.L<sup>-1</sup>), seguido nos meios contendo sulfato de amônio (10,58 g.L<sup>-1</sup>) e ureia (10,43 g.L<sup>-1</sup>). No meio controle, sem nenhuma fonte de nitrogênio adicional, identificou-se o menor crescimento dessa levedura, que foi de 9,94 g.L<sup>-1</sup>, mostrando a provável colaboração das fontes de nitrogênio para o incremento do crescimento desse micro-organismo. A linhagem de *Candida tropicalis* apresentou perfil semelhante quanto ao crescimento em células, contudo, nesse caso o meio contendo sulfato de amônio propiciou o maior crescimento (12,89 g.L<sup>-1</sup>), seguido por extrato de levedura (12,26 g.L<sup>-1</sup>) e ureia (10,63 g.L<sup>-1</sup>). Assim como a cepa de *Kluyveromyces marxianus* estudada, *C. tropicalis* teve seu menor crescimento no meio sem a adição de fontes de nitrogênio, o que reforça que, para o crescimento celular dessas leveduras, a adição dos suplementos investigados foi favorável.

Em relação ao consumo de xilose e glicose durante a fermentação, podemos observar, por meio da Figura 3.9, que *K. marxianus* CCA510 consumiu toda a glicose no meio controle e no meio contendo ureia em até 48h de fermentação. Por outro lado, a esse mesmo período, esse carboidrato ainda estava presente nos meios contendo sulfato de amônio (23,8%) e glicose (7,03%). A xilose, por sua vez, não foi consumida completamente em nenhum dos meios avaliados, podendo-se justificar pela repressão catabólica que a glicose exerce sobre o metabolismo de outros carboidratos (WANG *et al.*, 2013).

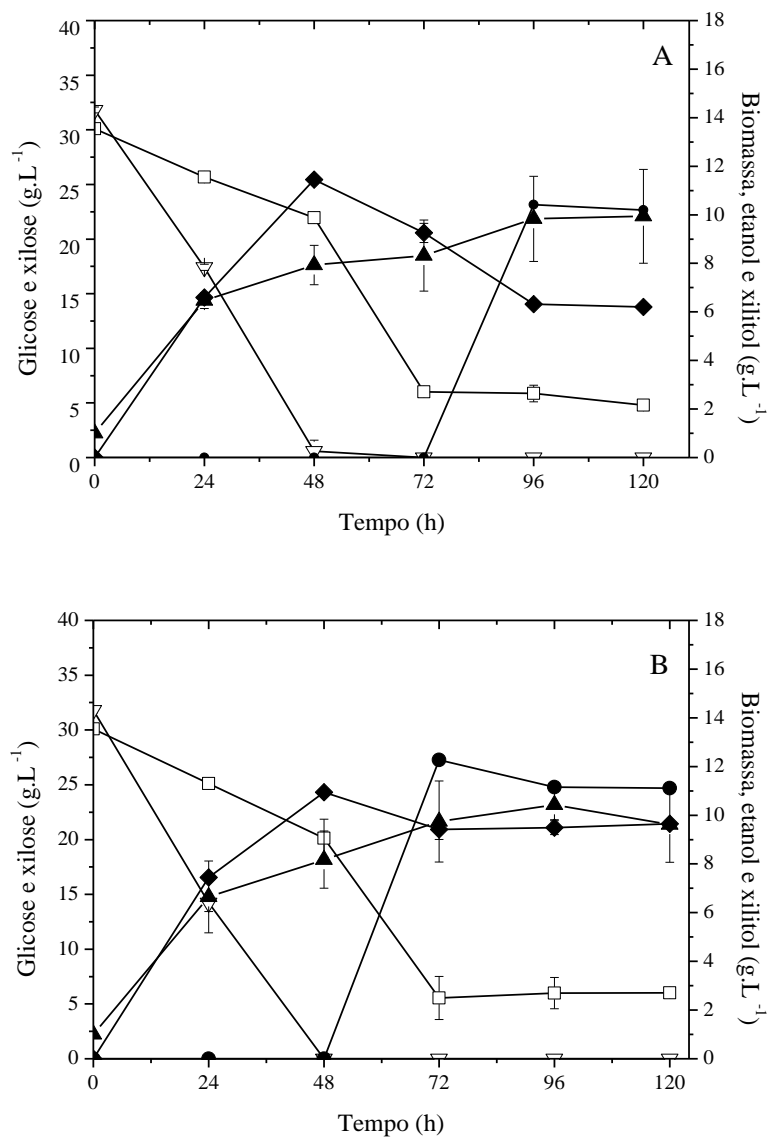
O consumo de glicose por *Candida tropicalis* foi mais efetivo quando alguma fonte orgânica de nitrogênio foi adicionada ao HBC (Figura 3.10). No caso da adição de ureia, em 48h, toda glicose foi consumida, já quando se adicionou extrato de levedura, a esse mesmo período, restava apenas 0,88% da quantidade inicial desse carboidrato. A xilose parece ter sido mais facilmente assimilável por *Candida tropicalis* do que *K. marxianus* CCA510 em praticamente todos os meios avaliados. Em 120h do processo fermentativo, *C. tropicalis* consumiu 100% da xilose no meio controle e nos meios com adição de ureia e sulfato de amônio. Já com a suplementação de extrato de levedura, esse micro-organismo não consumiu toda a xilose, encontrando-se um restante de 19,44% em relação à concentração inicial.

A maior produção de xilitol ( $12,27 \text{ g.L}^{-1}$ ) obtida quando se utilizou CCA510 foi no HBC contendo ureia como fonte de nitrogênio adicionada. O incremento dessa produção em relação ao meio controle, sem nenhuma fonte adicionada foi de 17,9%. A adição de sulfato de amônio e extrato de levedura não mostrou favorecer a produção de xilitol, não viabilizando essa suplementação. Ao invés de aumento na redução de xilitol, foi observada uma redução de cerca de 8% da mesma. Para *Candida tropicalis* a adição de nenhuma das três fontes de nitrogênio mostrou ser eficaz na melhoria substancial para produção de xilitol. Ao contrário disso, a partir do meio controle, sem a suplementação, obteve-se a maior concentração de xilitol ( $15,53 \text{ g.L}^{-1}$ ), seguida por ureia ( $15,47 \text{ g.L}^{-1}$ ), extrato de levedura ( $14,12 \text{ g.L}^{-1}$ ) e, finalmente, sulfato de amônio ( $10,94 \text{ g.L}^{-1}$ ).

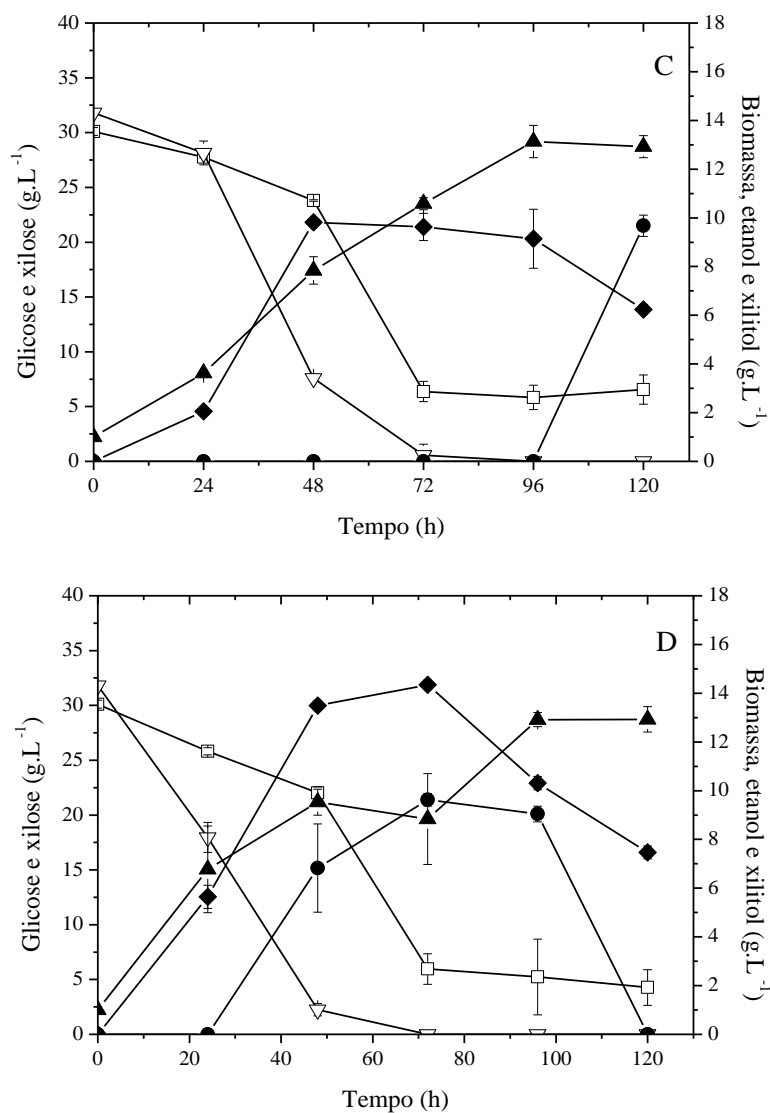
A análise de variância (ANOVA) a um nível de 5% de significância pelo teste Tukey mostrou que não houve diferença significativa na adição de nenhuma das fontes de nitrogênio adicionadas (ureia, sulfato de amônio e extrato de levedura) na

fermentação conduzida com a linhagem de *Kluyveromyces marxianus* CCA510, por outro lado, a adição de ureia melhorou a produção de xilitol em relação à adição de sulfato de amônio e extrato de levedura. No caso de *Candida tropicalis* nenhuma das fontes de nitrogênio teve efeito positivo significativo para a produção de xilitol, além disso, o sulfato de amônio mostrou uma interação negativa na produção do poliols. Observou-se, ainda, que a ureia e o extrato de levedura apresentaram diferença significativa em relação à adição de sulfato de amônio.

**Figura 3.9:** Cultivo por *Kluyveromyces marxianus* CCA510 de meios formados por HBC com diferentes fontes de nitrogênio (3 g.L<sup>-1</sup>) a 30 °C e 200 rpm: (A) sem fonte de nitrogênio, (B) ureia, (C) sulfato de amônio e (D) extrato de levedura. Biomassa (▲), etanol (◆), xilitol (●), glicose (▽) e xilose (□).

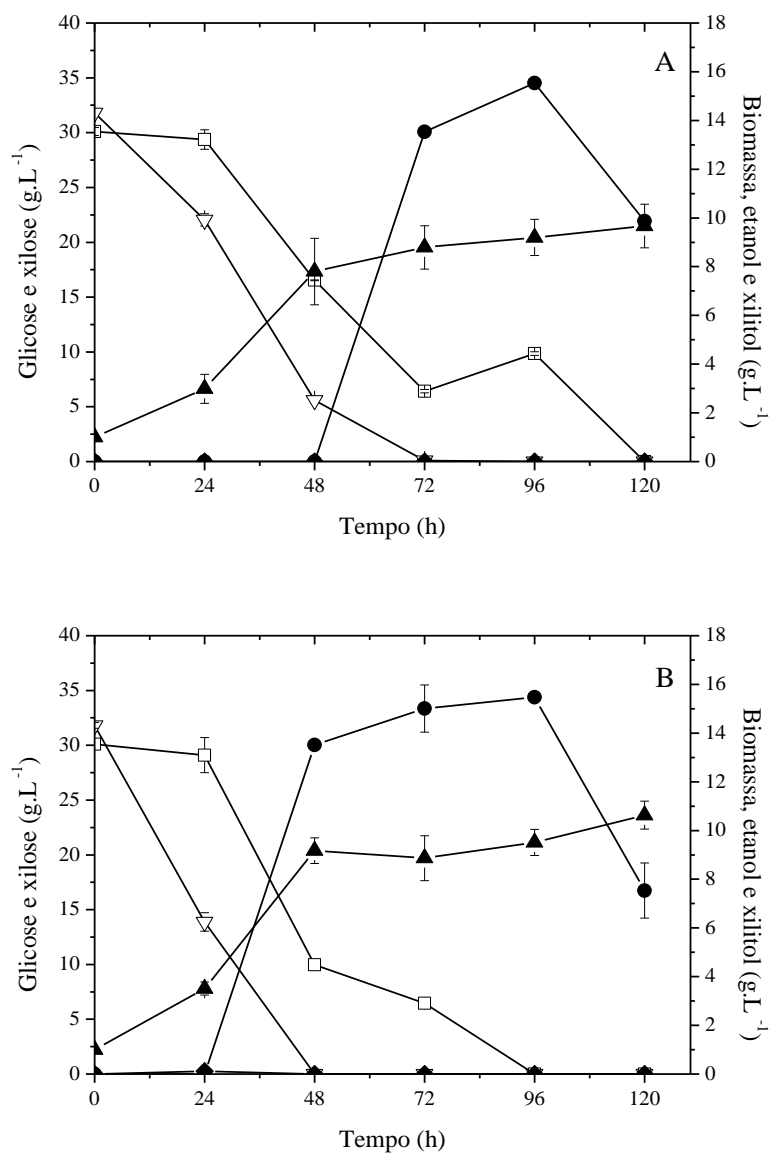


**Figura 3.9 (Continuação):** Cultivo por *Kluyveromyces marxianus* CCA510 de meios formados por HBC com diferentes fontes de nitrogênio (3 g.L<sup>-1</sup>) a 30 °C e 200 rpm: (A) sem fonte de nitrogênio, (B) ureia, (C) sulfato de amônio e (D) extrato de levedura. Biomassa (▲), etanol (◆), xilitol (●), glicose (▽) e xilose (□).

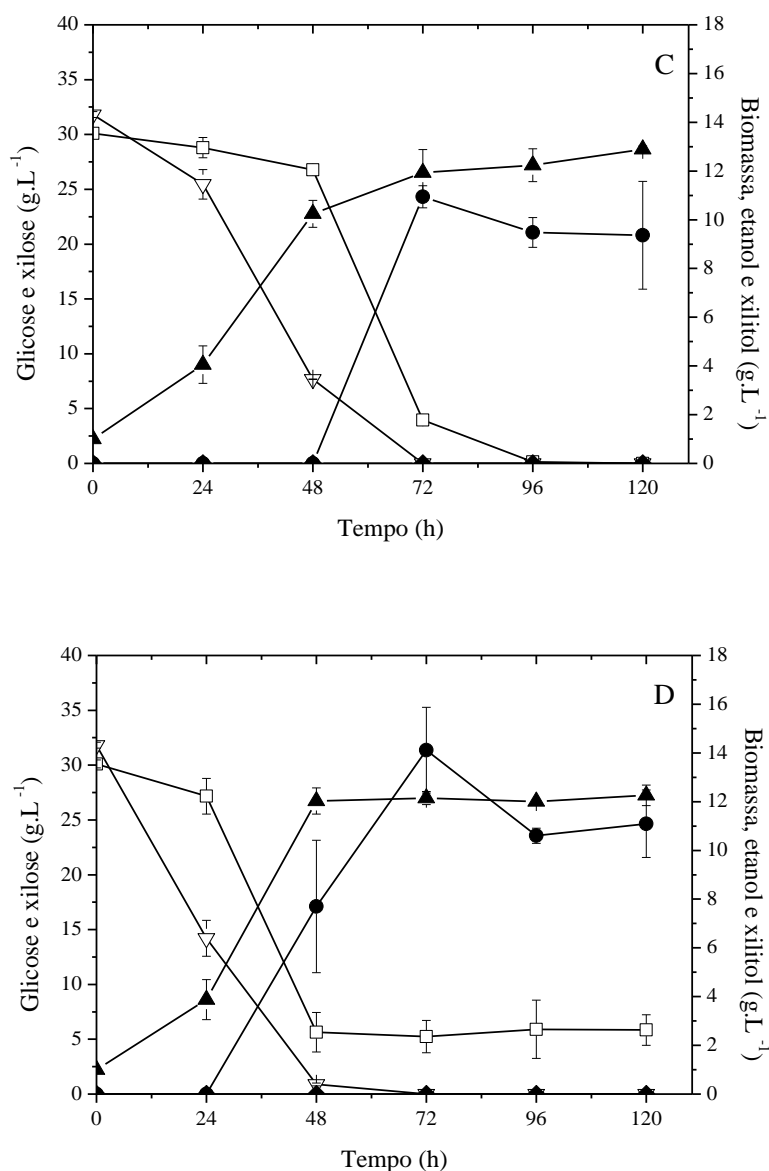




**Figura 3.10:** Cultivo por *Candida tropicalis* de meios formados por hidrolisado de bagaço de caju com diferentes fontes de nitrogênio (3 g.L<sup>-1</sup>) a 30 °C e 200 rpm: (A) sem fonte de nitrogênio, (B) ureia, (C) sulfato de amônio e (D) extrato de levedura. Biomassa (▲), etanol (◆), xilitol (●), glicose (▽) e xilose (□).



**Figura 3.10 (Continuação):** Cultivo por *Candida tropicalis* de meios formados por hidrolisado de bagaço de caju com diferentes fontes de nitrogênio (3 g.L<sup>-1</sup>) a 30 °C e 200 rpm: (A) sem fonte de nitrogênio, (B) ureia, (C) sulfato de amônio e (D) extrato de levedura. Biomassa (▲), etanol (◆), xilitol (●), glicose (▽) e xilose (□).



Calculou-se, ainda, o rendimento de xilitol com base no consumo de xilose consumida ( $Y_{PI/SI}$ ) pelos dois micro-organismos avaliados, o que está apresentado na Tabela 3.6. Esses valores foram obtidos por meio da equação 3.5.

Para *K. marxianus* CCA510 observa-se que a maior produtividade de xilitol foi de 0,50 g.g<sup>-1</sup> no meio contendo ureia adicionada como fonte de nitrogênio (Tabela 3.7). Já a menor foi obtida com a adição de extrato de levedura, Ressalta-se que com a adição de ureia obteve-se 14% a mais de produtividade. *Candida tropicalis* teve sua produtividade de xilitol diminuída com a adição de sulfato de amônio e extrato de levedura sido influencia. Já a ureia teve valor semelhante (0,51 g.g<sup>-1</sup>) ao obtido no hidrolisado controle (0,52 g.g<sup>-1</sup>)

**Tabela 3.6:** Rendimentos de xilitol por *K. marxianus* CCA510 e *Candida tropicalis* no hidrolisado (HBC) com diferentes fontes de nitrogênio.

Micro-organismo	Rendimento de xilitol ( $Y_{PI/SI}$ ) em g <sub>xilitol</sub> /g <sub>xilose</sub> (g.g <sup>-1</sup> )			
	Controle	Ureia	Sulfato de amônio	Extrato de levedura
<i>K. marxianus</i> CCA510	0,43	0,50	0,41	0,40
<i>Candida tropicalis</i>	0,52	0,51	0,42	0,46

A Tabela 3.7 apresenta a quantidade e diversidade de fontes de nitrogênio adicionadas a hidrolisados hemicelulósicos visando a produção de xilitol por diversos autores. Muitas são as pesquisas que investigam a influência da utilização de ureia, como fonte de nitrogênio, para a produção de xilitol. Rodrigues, Kenealy e Jeffries (2011), por exemplo, averiguaram os efeitos do uso de ureia e sulfato de amônio, como fontes de nitrogênio, na produção de xilitol por *P. stipitis* YS-30. O meio, que continha hidrolisado de palha de milho, foi suplementado com 5,0 g.L<sup>-1</sup> de ureia ou 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio a título de comparação. Observou-se que utilizando a ureia ao invés de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aumentou-se o consumo de xilose e as taxas de produção de etanol em 25 e 34%, respectivamente.

Soleimani e Tabil (2013) estudaram a importância e interações do controle do pH e designificação do meio derivado de casca de aveia para produção de xilitol por *Candida guilliermondii*. Além disso, avaliaram a influência da suplementação do meio com uma fonte de nitrogênio, que foi sulfato de amônio. Os resultados mostraram que a

destoxificação do meio foi o fator menos importante para produção e produtividade, já a suplementação com a fonte de nitrogênio o fator mais importante, concluindo que essa fonte inorgânica pode melhorar as taxas de produção de xilitol a partir do hidrolisado.

Mushtaq *et al.* (2013) avaliaram a produção de xilitol a partir de casca de feijão para produção de xilitol por *Candida tropicalis*. Esses autores testaram diversas fontes de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , ureia,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{NaNO}_3$ ) visando à otimização da produção quanto a esse parâmetro, contudo os resultados se mostraram divergentes ao observados no presente estudo já que todas as fontes empregadas favoreceram a melhoria da concentração de xilitol. Os resultados desses cientistas também levaram a observação de uma melhoria da produção de xilitol quando se adicionou ureia ao meio. Também se notou que, quando se adicionou extrato de levedura a concentrações acima de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ , a produção de xilitol foi reduzida, o que pode conduzir a hipótese que as fontes empregadas no presente capítulo podem ter sido em quantidades inadequadas para a melhoria do processo, necessitando de experimentos em que ocorram a variação das concentrações das fontes de nitrogênio estudadas.

O estudo com diferentes fontes de nitrogênio no HBC mostrou que os resultados são variáveis de acordo com a linhagem de micro-organismo utilizada. No caso dos micro-organismos avaliados, *C. tropicalis* e *K. marxianus* CCA510, não notou-se diferença significativa na produção de xilitol com nenhuma das suplementações, contudo um incremento na produção de biomassa celular foi observado. Dessa forma, não é viável a suplementação do HBC com fontes adicionais de nitrogênio para a produção fermentativa de xilitol. As fontes de nitrogênio podem influenciar positivamente ou negativamente na produção de xilitol dependendo do micro-organismo utilizado no processo fermentativo. A adição do extrato de levedura aumentou o crescimento em biomassa de *Kluyveromyces marxianus* em relação às demais fontes avaliadas. *Candida tropicalis* teve seu crescimento incrementado com a adição de sulfato de amônio, contudo essa fonte de nitrogênio influenciou negativamente a produção de xilitol. As fontes de nitrogênio, nas concentrações avaliadas, não mostraram influenciar significativamente a produção de xilitol pelas leveduras avaliadas.

**Tabela 3.7:** Fontes de nitrogênio utilizadas em fermentações visando à produção d xilitol por leveduras.

Micro-organismo	Hidrolisado	Fonte de nitrogênio	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Referência
<i>C. guilliermondii</i> NRRL-Y2075	Casca de soja	Extrato de levedura	5,0	Michel, 2007
<i>C. tropicalis</i>	Resíduos de madeira	Ureia	10	Ko <i>et al.</i> , 2008
<i>Pichia stipitis</i> YS-30	Palha de milho	Sulfato de amônio	5,0	Rodrigues, Kenealy e Jeffries, 2008
<i>C. athensensis</i> SB18	Resíduos hortícolas	Ureia	1,0	Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Sabugo de milho	Extrato de levedura	3,0	Pérez-Bibbins <i>et al.</i> , 2013
<i>C. tropicalis</i> e <i>K. marxianus</i> CCA510	Bagaço de caju	Ureia, sulfato de amônio e extrato de levedura	3,0	Presente trabalho

#### 4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, pode-se considerar o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju um potencial meio de cultivo para produção biotecnológica de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* CCA510 e *Candida tropicalis*. Tratamentos de destoxificação podem ser utilizados para redução dos compostos tóxicos presentes no meio sem perdas significativas de açúcares, porém a necessidade pode variar de acordo com o micro-organismo utilizado. As fontes de nitrogênio podem influenciar positivamente ou negativamente o crescimento do micro-organismo utilizado no bioprocesso, porém, nas concentrações avaliadas, não influenciaram significativamente a produção de xilitol pelas leveduras estudadas.

## 5 REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, J.R.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B., LIDÉN G, GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 340-349, 2007.
2. ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. D. C. L. B.; SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. D. G. D. A. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, v. 22, n. 4, p. 815-22, 2011.
3. BOUSSARSAR, H.; ROGÉ, B.; MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. **Bioresource Technology**, v.100, p.6537-6542, 2009.
4. BRANCO, F. R.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3241-3246, 2011.
5. BURA, R.; VAJZOVIC, A. DOTY, S. L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**., v. 39, n. 10, p. 1453-1463, 2012.
6. CASTRO, J. F.; PARRA, C.; YA, M.; ROJAS, J.; TEIXEIRA, R.; BAEZA, J.; FREER, J. Optimal pretreatment of *Eucalyptus globulus* by hydrothermolysis and alkaline extraction for microbial production of ethanol and xylitol, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.52, p. 5713-5720, 2013.
7. CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. **BioEnergy Research**, v. 6, p. 388-401, 2012.
8. CHEN, X.; JIANG, Z.-H.; CHEN, S.; QIN, W. Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application. **International journal of biological sciences**, v. 6, n. 7, p. 834-44, 2010.
9. CHENG, K-K.; ZHANG, J-A.; LING, H-Z.; PING, W-XI; HUANGA, W; GE, J-P., XU, J-M. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 203-207, 2009.
10. CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Improved xylitol production in media containing phenolic aldehydes: application of response surface methodology for optimization and modeling of bioprocess. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 1, p. 33-38, 2010.

11. DASHTBAN, M.; KEPKA, G.; SEIBOTH, B.; QIN, W. Xylitol production by genetically engineered *Trichoderma reesei* strains using barley straw as feedstock. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, p. 554-569, 2013.
12. FONSECA, B. G.; MOUTTA, R. O.; FERRAZ, F. O.; VIEIRA, E. R.; NOGUEIRA, A. S.; BARATELLA, B. F.; RODRIGUES, L. C.; RUI, Z. H. ; SILVA, S. S. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 38, p. 199-207, 2011.
13. FRANCESCHIN, G.; SUDIRO, M.; INGRAM, T.; SMIRNOVA, I.; BRUNNER, G.; BERTUCCO, A. Conversion of rye straw into fuel and xylitol: a technical and economical assessment based on experimental data. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 6, p. 631-640, 2011.
14. GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n.6, p.1500-1503, 2009.
15. HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H.; DE BONT, J. A. M. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends Biotechnology**, v.12, p. 409-415, 1994.
16. HUANG, C.-F.; JIANG, Y.-F.; GUO, G.-L.; WANG, W.-S. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3322-9, 2011.
17. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, v.24, n. 2, p.1-82 fev, 2011.
18. KAMAT, S.; GAIKWAD, S.; KUMAR, A. R.; GADE, W. N. Xylitol production by *Cyberlindnera (Williopsis) saturnus*, a tropical mangrove yeast from xylose and corn cob hydrolysate. **Journal of applied microbiology**, 2013.
19. KO, C. H.; CHIANG, P. N.; CHIU, P. C.; LIU, C.C.; YANG, C.L.; SHIAU, I.L. Integrated xylitol production by fermentation of hardwood wastes. **Chemical Technology**, v. 83, p. 534-540, 2008.
20. KUMAR, S.; SINGH, S. P.; MISHRA, I. M.; ADHIKARI, D. K. Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IPE453. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 36, p.1483-1489, 2009.
21. LI, M.; MENG, X.; DIAO, E.; DU, F. Xylitol production by *Candida tropicalis* from corn cob hemicellulose hydrolysate in a two-stage fed-batch fermentation process. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 387-382, 2012.



22. MÄKI-ARVELA, P.; SALMI, T.; HOLMBOM, B.; WILLFÖR, S.; MURZIN, D. Y. Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses- A Review. **Chemical Reviews**, v., 111, p. 5638-5666, 2011.
23. MARTÍNEZ, M. L.; SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V. Production of xylitol and ethanol by *Hansenula polymorpha* from hydrolysates of sunflower stalks with phosphoric acid. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 160-166, 2012.
24. MARTON, J.M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2002.
25. MATEO, S.; ROBERTO, I. C.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A. J. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 196-203, 2013.
26. MICHEL, A. C. S. **Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casca de soja** 2002. 75p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
27. MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; SAXENA, R. K. Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1596-601, 2013.
28. MUSHTAQ, Z.; IMRAN, M.; ZAHOR, T.; AHMED, R. S.; ARSHAD, M. U. Biochemical perspectives of xylitol extracted from indigenous agricultural by-product (*Mongbean hulls*) in rats modelling. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2013.
29. MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 401-413, 2002.
30. PARAJO, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 25-40, 1998.
31. PÉREZ-BIBBINS, B.; SALGADO, J. M.; TORRADO, A.; AGUILAR-USCANGA, M. G.; DOMÍNGUEZ, J. M. Culture parameters affecting xylitol production by *Debaryomyces hansenii* immobilized in alginate beads. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 387-397, 2013.
32. PRAKASH, G.; VARMA, A. J.; PRABHUNE, A.; SHOUCE, Y.; RAO, M. Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose

using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3304-3308, 2011.

33. RAFIQU, I. S. M.; SAKINAH, M. M. Design of process parameters for the production of xylose from wood sawdust. **Chemical Engineering Research and Design**, v.90, n. 9, p. 1307-1312, 2012.

34. ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; ARAÚJO, G. T., CURVELO, A. A. S. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: PROCEEDINGS OF THE FIFTH BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, v. 6, p. 3-8, 1997.

35. ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1099-107. 2011.

36. RODRIGUES, M. R. C.; RONDINA, D.; ARAÚJO, A. A.; SOUZA, A. L., PINHEIRO D. C. N.; FERNANDES, A. A. O.; IBIAPINA, F. L. Respostas reprodutivas e metabólicas de ovelhas alimentadas com bagaço de caju desidratado, durante o pós-parto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n.1, p.171-179, 2011.

37. RODRIGUES, R. C. L. B.; KENEALY, W. R.; JEFFRIES, T. W. Xylitol production from DEO hydrolysate of corn stover by *Pichia stipitis* YS-30. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 10, p. 1649-55, 2011.

38. SANTOS, R. P.; SANTIAGO, A. A. X.; GADELHA, C. A. A.; CAJAZEIRAS, J. B.; CAVADA, B. S.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; SANTOS, R. P.; FREIRE, V. N. Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 1432-1437, 2007.

39. SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; LUCHESE, R. H.; SILVA, S. S. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian. Journal of Microbiology**, v. 35, 248-254, 2004.

40. SILVA, O. O. **Aproveitamento do bagaço de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merril) para produção biotecnológica de xilitol**. 2011. 121 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

41. SOLEIMANI, M.; TABIL, L. Interaction of medium detoxification /supplementation and cell recycling in fermentative xylitol production. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 31, n. 4, p. 208-216, 2013.

42. VAJZOVIC, A.; BURA, R.; KOHLMEIER, K.; DOTY, S. L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 II: production of xylitol and ethanol in the presence of inhibitors. **Journal of industrial microbiology & Biotechnology**, v. 39, 1453-63, 2012.
43. VILLA, P. *et al.* Influence of phenolic compounds on the bioprocess of xylitol production by *Candida guilliermondii*. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOCHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, 2. 1998, Porto-Portugal.
44. VILLARREAL, M. L. M. **Avaliação do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de resíduos de eucalipto, com carvão ativo e resinas de troca iônica, para a produção de xilitol.** 2005. 132p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2005.
45. WALKER, G. M. **Yeast-Physiology and Biotechnology.** New York, Wiley, 1998.321p.
46. WALTHER, T., HENSIRISAK, P., AGBLEVOR, F. A. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Bioresource technology**, v. 76, n. 213-20, 2001.
47. WANG, R., LI, L., ZHANG, B., GAO, X., WANG, D., HONG, J. Improved xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperature through construction of a xylose isomerase pathway. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 40, p. 841-54, 2013.
48. WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86, n.1, p.1-14, 1998.
49. ZHANG, J.; GENG, A.; YAO, C.; LU, Y.; LI, Q. Xylitol production from D-xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. **Bioresource technology**, v.105, p. 134-41, 2012.
50. ZHUANG, J.; LIN, L.; YONG, S.; PANG, C. Detoxification of wheat strew formic acid hydrolysis and xylitol production. **Advanced Materials Research**, v. 383-390, p. 5453-57, 2011.