



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

**JULIANA DE FRANÇA SERPA**

**PRODUÇÃO DA ENZIMA XILOSE REDUTASE POR *Candida tropicalis*  
ATCC750 USANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DO BAGAÇO DE  
CAJU**

**FORTALEZA**

**2016**

JULIANA DE FRANÇA SERPA

PRODUÇÃO DA ENZIMA XILOSE REDUTASE POR *Candida tropicalis* ATCC750  
USANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DO BAGAÇO DE CAJU

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará - UFC, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte  
Rocha

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S495p Serpa, Juliana de França.  
Produção da enzima xilose redutase por *Candida tropicalis* ATCC750 usando hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju / Juliana de França Serpa. – 2016.  
68 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Maria Valdeez Ponte Rocha.

1. Bioprocesso.. 2. Xilose redutase.. 3. Xilitol.. 4. Bagaço de caju.. 5. *Candida tropicalis*.. I. Título.  
CDD 660

---

JULIANA DE FRANÇA SERPA

PRODUÇÃO DA ENZIMA XILOSE REDUTASE POR *Candida tropicalis* ATCC750  
USANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DO BAGAÇO DE CAJU

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará - UFC, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: 15 / 03 / 2016.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Valderez Ponte Rocha (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. André Casimiro de Macedo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Alves Soares  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

Dedico este trabalho ao meu avô Monarci Sátiro (*in memoriam*), que sempre estará presente em nossas vidas. Aos meus pais, Salustiano (*in memoriam*) e Juliete por todo o amor e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo, pela vida!

Aos meus pais Juliete e Salustiano por todo o amor, esforço e dedicação que tiveram comigo em todos os momentos da minha vida. Em especial, agradeço ao meu pai que não se encontra presente em corpo, mas que se eternizou em nossos corações. A ele todo o meu agradecimento.

Aos meus irmãos Tatiana, Thiago e Salustiano Júnior por todo o apoio durante a minha caminhada.

À minha orientadora, Dra. Maria Valderez Ponte Rocha por todo o conhecimento, dedicação, apoio e confiança na realização deste trabalho. Mais do que orientadora, você é uma amiga que sabe ouvir e aconselhar para a vida. Obrigada Val, por tudo. Sem palavras...

A todos os amigos que me acolheram no grupo do GPBio e tornaram meu dias mais prazerosos. Em ordem alfabética, agradeço à Brenda, Bruna, Camilla, Cris, Fátima, Jocélia, Mary, Natália, Natan, Renata Déborah, Renata Jerônimo e Ticiane. Aos companheiros de laboratório e parceiros no trabalho, Andro e Breno.

Em especial, àquelas que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando sempre, agradeço à Carla e Dayala por tudo, pela companhia e apoio em tudo o que precisei. Jessica e Jouce, obrigada por serem quem vocês são, sempre ajudando a todos como podem, se preocupando com o trabalho do próximo sem medir esforços. Sou eternamente grata por tudo o que fizeram e fazem por mim.

Ao professor Carlos Eduardo, meus mais sinceros agradecimentos por todo o apoio e colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao professor André Casimiro, por colaborar como banca examinadora deste projeto. Obrigada por todo conhecimento compartilhado.

À Universidade Federal do Ceará que através do Departamento de Engenharia Química nos oferece o espaço físico para a realização de nossas atividades.

Ao programa CAPES, que através do CNPQ me concedeu a bolsa como apoio para os estudos.

Ao senhor Luís, por todo o serviço prestado na UFC e por sua amizade.

Que Deus abençoe cada um de vocês!

“O coração do homem planeja o seu caminho, mas o SENHOR lhe dirige os passos”.

Provérbios 16:9

## RESUMO

A enzima xilose-redutase (EC 1.1.1.21) tem potencial aplicação na produção de xilitol a partir de xilose, e é uma enzima intracelular comumente encontrada em leveduras. O xilitol é um açúcar-álcool utilizado em indústrias alimentícia, odontológica, farmacêutica e de cosmético. A produção em larga escala desta enzima, bem como a sua aplicação industrial para a fabricação de xilitol e outros bioprodutos de valor agregado, tem sido limitado devido ao alto preço da xilose comercial. Este problema tem incentivado aos pesquisadores a trabalhar para o desenvolvimento de melhores técnicas para reduzir os custos de obtenção da XR, como, por exemplo, a busca por novas fontes de matéria-prima e condições do processo. Entre as possíveis matérias-primas, os materiais lignocelulósicos como, o bagaço de caju, são fontes de baixo custo com potenciais aplicações em bioprocessos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção da enzima xilose redutase (XR) e de xilitol por processos biotecnológicos, através da levedura *Candida tropicalis* ATCC750 utilizando o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (BC) como substrato. O hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju (HBCD) foi obtido por hidrólise com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) diluído e aplicado como meio de cultivo. A produção da enzima foi realizado por bioprocessos conduzidos em agitador orbital a 150 rpm a diferentes temperaturas (25 °C, 30 °C, 35 °C e 45 °C). O extrato enzimático produzido foi utilizado para reduzir a xilose em xilitol e determinou-se a atividade da XR através da reação de oxidação de NADPH a 25 °C. De acordo com os dados analisados, o maior crescimento microbiano foi observado nas temperaturas de 25 °C e 30 °C, e diminuiu consideravelmente a 40 °C usando o meio hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju (HBCD). Nas condições avaliadas, não houve a produção de xilitol ocorrendo, no entanto, a produção da enzima xilose redutase e de etanol. A XR da *Candida tropicalis* resultou em um extrato bruto com uma maior atividade enzimática na temperatura de produção de 25 °C (0,265 U/mL). Na caracterização parcial da enzima, pH e a temperatura ótima da atividade enzimática foram pH 7,0 e 50 °C, respectivamente. Posteriormente, realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes para a identificação das frações da enzima, obtendo uma indicação de uma estrutura dimérica com peso molecular de, aproximadamente, 30 KDa. Com os resultados apresentados, pode-se considerar que o hidrolisado de bagaço de caju não favoreceu a produção de xilitol, contudo, é um meio potencial para a produção biotecnológica da enzima xilose redutase (XR).

**Palavras-chave:** Bioprocesso. Xilose redutase. Xilitol. Bagaço de caju. *Candida tropicalis*.

## ABSTRACT

Xylose reductase enzyme (EC 1.1.1.21) has potential application in the production of xylitol, and is an intracellular enzyme commonly found in yeast. Xylitol is a carbohydrate-alcohol used in food, dental, pharmaceutical and cosmetic industries. The large-scale production of this enzyme, as well as its industrial application for the production of xylitol and other bioproducts, has been limited due to the high price of commercial xylose. This problem has motivated researchers to develop better techniques for reducing the costs of obtaining XR, for example, the search for new raw material and the process conditions. Among possible feedstocks, lignocellulosic materials, as cashew apple bagasse, are low cost sources with potential applications in bioprocesses. In this context, the aim of this study was to evaluate the production of xylose reductase enzyme (XR) and xylitol by biotechnological processes by the yeast *Candida tropicalis* ATCC750 and hemicellulose hydrolysate from cashew apple bagasse (CAB) as substrate. The hemicellulose hydrolysate from cashew apple bagasse (HBCD) was obtained by acid hydrolysis with diluted sulfuric acid ( $H_2SO_4$ ) and it used as a culture medium. The processes were conducted in orbital shaker at 150 rpm and different temperatures (25 °C, 30 °C, 35 °C and 45 °C). The xylose reductase enzyme extracts were used to reduce xylose to xylitol and the XR activity was determined by NADPH oxidation reaction at 25 °C. According to the analyzed data using hemicellulose hydrolysate (HBCD) medium, the highest microbial growth was observed at 25 °C and 30 °C and slightly growth at 40 °C. Under the experimental conditions evaluated, the production of xylitol was not observed, but there were the production of xylose reductase enzyme and ethanol. The XR from *Candida tropicalis* resulted in a crude extract with a higher enzymatic activity in the temperature of production at 25 °C (0.265 U/mL). In the partial characterization of the enzyme, the optimum pH and temperature were 7.0 and 50 °C, respectively. Subsequently, the gel electrophoresis was performed under denaturing conditions for identification of the enzyme fractions, which identify a heterodimeric structure with a molecular weight of approximately 30 kDa. The results showed that the cashew apple bagasse hydrolysate did not favor the xylitol production in the studied conditions; however, it is a potential means for biotechnological production of the enzyme xylose reductase (XR).

**Keywords:** Bioprocess. Xylose reductase. Xylitol. Cashew apple bagasse. *Candida tropicalis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Esquema ilustrativo da via metabólica da xilose e glicose .....	18
Figura 2	- Estrutura da holoenzima dimérica xilose redutase de <i>Candida tenuis</i> . (A) Estrutura completa e (B) estrutura apresentada pelos dímeros.....	19
Figura 3	- Estrutura da parede celular dos vegetais.....	25
Figura 4	- Fluxograma do pré-tratamento e processo de hidrólise ácida do bagaço de caju.....	29
Figura 5	- Porcentagem de hemicelulose de alguns materiais lignocelulósicos.....	44
Figura 6	- Concentração de xilose no liquor após hidrólise ácida de alguns materiais lignocelulósicos .....	44
Figura 7	- Perfil do crescimento celular, concentração de xilose, etanol e xilitol no bioprocesso para a produção da enzima xilose redutase por <i>Candida tropicalis</i> ATCC750, utilizando o meio formulado (MF) a diferentes temperaturas: (A) 25 °C, (B) 30 °C, (C) 35 °C e (D) 40 °C. Os dados experimentais são: (■) Concentração celular (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) Xilose (g.L <sup>-1</sup> ); (▼) Etanol (g.L <sup>-1</sup> ); e (Δ) Xilitol (g.L <sup>-1</sup> ).....	46
Figura 8	- Influência da temperatura no crescimento celular e produção de xilitol por <i>Candida tropicalis</i> ATCC750 usando o meio formulado (MF). Dados experimentais: (■) Máxima concentração de xilitol (g.L <sup>-1</sup> ); (●) Máxima concentração celular (g.L <sup>-1</sup> ).....	48
Figura 9	- Influência da temperatura na velocidade específica de crescimento da levedura <i>Candida tropicalis</i> ATCC750 cultivada em meio formulado a diferentes temperaturas: (■) 25 °C, (●) 30 °C; (▲) 35 °C; (▼) 40 °C. Dados reportados com 72 h de processo e 150 rpm de acordo com cada temperatura	49
Figura 10	- Perfil do crescimento celular, concentração de carboidratos e etanol no bioprocesso utilizando o meio hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju (HBCD) por <i>Candida tropicalis</i> ATCC750 durante 72 h e 150 rpm em diferentes temperaturas: (A) 25 °C, (B) 30 °C, (C) 35 °C e (D) 40 °C. Os dados experimentais: (■) Concentração celular (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) Xilose (g.L <sup>-1</sup> ); (●) Glicose (g.L <sup>-1</sup> ); (▼) Etanol (g.L <sup>-1</sup> ).....	51

Figura 11 - Influência da temperatura na velocidade específica de crescimento usando o meio hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju por <i>Candida tropicalis</i> ATCC750. Dados reportados com 72 h de processo e 150 rpm de acordo com cada temperatura. Os dados experimentais são: (■) 25 °C, (●) 30 °C; (▲) 35 °C; (▼) 40 °C.....	53
Figura 12 - Dados experimentais do processo de fermentação utilizando o meio hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju por <i>Candida tropicalis</i> ATCC750 a 30 °C e 150 rpm, através de dois procedimentos: (A) meio hidrolisado (HBCD), (B) meio hidrolisado suplementado com 20 (g.L <sup>-1</sup> ) de xilose e (C) meio hidrolisado acrescentado de 40 (g.L <sup>-1</sup> ) de xilose. Os dados experimentais são os seguintes: (■) Concentração celular; (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) Xilose (g.L <sup>-1</sup> ); (●) Glicose (g.L <sup>-1</sup> ); (▼) Etanol (g.L <sup>-1</sup> ).....	55
Figura 13 Influência do pH na atividade enzimática da enzima xilose redutase de <i>Candida tropicalis</i> ATCC750 a 25 °C, produzida utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju (HBCD) como substrato.....	56
Figura 14 Influência da temperatura na atividade enzimática da enzima xilose redutase de <i>Candida tropicalis</i> ATCC750 a pH 7.0, produzida a 25 °C, utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju (HBCD) como substrato.....	57
Figura 15 Eletroforese em SDS-PAGE do extrato enzimático de XR de <i>Candida tropicalis</i> ATCC750 produzida em diferentes meios e a diferentes temperaturas.....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Produtos que possuem xilitol na formulação.....	22
Tabela 2	- Algumas vantagens e desvantagens dos processos de produção do xilitol.....	23
Tabela 3	- Composição de alguns materiais lignocelulósicos.....	25
Tabela 4	- Composição do bagaço de caju in natura e após hidrólise com ácido sulfúrico	41
Tabela 5	- Composição elementar do hidrolisado do bagaço de caju sem ajuste do pH, com ajuste do pH e detoxificado.....	42
Tabela 6	- Influência da temperatura no crescimento celular e produção de xilitol por <i>Candida tropicalis</i> ATCC750 utilizando o meio formulado (MF). Dados reportados com 72 h de processo e 150 rpm de acordo com cada temperatura.	47
Tabela 7	- Influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase por <i>Candida tropicalis</i> ATCC750 usando meio formulado (MF). Dados reportados com 72 h de processo e 150 rpm de acordo com cada temperatura.	47
Tabela 8	- Influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase por <i>Candida tropicalis</i> ATCC750 usando meio hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBCD). Dados reportados com 72 h de processo e 150 rpm de acordo com cada temperatura.....	52
Tabela 9	- Estudo da concentração inicial de xilose no meio hidrolisado do bagaço de caju.....	56

## NOMENCLATURA

BC	Bagaço de caju
HBC	Hidrolisado do bagaço de caju
HBC – 1	Hidrolisado do bagaço de caju com pH ajustado
HBCD	Hidrolisado do bagaço de caju com pH ajustado e tratado com carvão (detoxificado)
HPLC	Do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
MF	Meio formulado
PF	Via pentose fosfato
P <sub>1máx</sub>	Máxima concentração de xilitol
P <sub>2máx</sub>	Máxima concentração de etanol
Q <sub>P1</sub>	Produtividade referente ao xilitol
RPM	Rotações por minuto
TKL 1	Trascetolase
TAL 1	Transaldola
UV	Ultra violeta
XR	Xilose redutase
XDR	Xylitol desidrogenase
XK	Xiluloquinase
$\mu_x$	Velocidade específica de crescimento (g. L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Y <sub>P1/S1</sub>	Rendimento referente ao xilitol
Y <sub>X/S</sub>	Rendimento do crescimento celular baseado no consumo do substrato substrato (g células . g substrato)
Y <sub>P/S</sub>	Rendimento do produto (xilitol) baseado no consumo do substrato (g xilitol. g substrato)
YEPD	Do inglês <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Enzima xilose redutase (XR).....	18
2.1.1	<i>Processos de produção da enzima xilose redutase (XR)</i> .....	20
2.2	Aplicação da enzima xilose redutase: produção de xilitol.....	21
2.2.1	<i>Propriedades e aplicações do xilitol</i> .....	22
2.2.2	<i>Processos de produção de xilitol</i> .....	23
2.3	Matérias-primas lignocelulósicas.....	24
2.3.1	<i>Celulose</i> .....	26
2.3.2	<i>Hemicelulose</i> .....	26
2.3.3	<i>Lignina</i> .....	27
2.4	Bagaço de caju como matéria-prima.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	Bagaço de caju.....	29
3.2	Hidrólise ácida do bagaço de caju: obtenção do hidrolisado hemicelulósico	29
3.3	Processo de detoxificação do hidrolisado de bagaço de caju.....	30
3.4	Micro-organismo <i>Candida tropicalis</i> ATCC750.....	30
3.4.1	<i>Armazenamento do micro-organismo</i> .....	30
3.5	Preparação do inóculo do micro-organismo.....	31
3.6	Processo fermentativo para a produção da enzima xilose redutase.....	31
3.6.1	<i>Estudo da influência da temperatura</i> .....	32
3.6.2	<i>Estudo da concentração inicial de xilose</i> .....	32
3.7	Processo de extração da enzima xilose redutase (XR).....	32
3.8	Determinação da atividade enzimática da xilose redutase (XR)	33
3.9	Caracterização da enzima XR produzida	34
3.9.1	<i>Estudo do pH ótimo e temperatura ótima da XR</i>	34
3.9.2	<i>Análise de SDS-PAGE de cultura sobrenadante</i>	34
3.10	Métodos analíticos	35
3.10.1	<i>Determinação da concentração celular</i>	35
3.10.2	<i>Determinação de carboidratos, xilitol e etanol</i>	35
3.10.3	<i>Determinação do teor de proteínas</i>	35

<b>3.10.4</b>	<b><i>Caracterização do bagaço de caju</i></b>	35
3.10.4.1	<i>Determinação de sólidos totais</i>	36
3.10.4.2	<i>Determinação de extraíveis</i>	36
3.10.4.2.1	Hidrólise do bagaço com ácido sulfúrico e preparação para análises	37
3.10.4.2.2	Lignina insolúvel em ácido (LIA)	37
3.10.4.2.3	Lignina solúvel em ácido (LSA)	38
3.10.4.3	<i>Análise dos carboidratos, furfural, hidrometilfurfural e ácidos orgânicos para determinação da celulose e hemicelulose</i>	38
<b>3.10.5</b>	<b><i>Cálculo dos parâmetros cinéticos</i></b>	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	41
<b>4.1</b>	<b>Caracterização do bagaço de caju antes e após hidrólise ácida</b>	41
<b>4.2</b>	<b>Influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase e do xilitol utilizando meio formulado (MF)</b>	45
<b>4.3</b>	<b>Influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase e do xilitol utilizando hidrolisado do bagaço de caju (HBCD)</b>	50
<b>4.4</b>	<b>Influência da concentração inicial de xilose</b>	54
<b>4.5</b>	<b>Caracterização parcial da enzima xilose redutase (XR)</b>	56
<b>4.5.1</b>	<i>Estudo do pH ótimo e temperatura ótima</i>	56
<b>4.5.2</b>	<i>Eletroforese e identificação de proteínas da xilose redutase</i>	58
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	60
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	61

## 1 INTRODUÇÃO

A xilose redutase (XR) é uma enzima oxido-redutase, pertencente ao membro da família da aldose-redutase (EC 1.1.1.21), geralmente encontradas em leveduras e fungos, além de ser comumente dependente de NADPH. Esta enzima é utilizada como catalisador na produção de xilitol, um poliol que apresenta diversas aplicações alimentícias, farmacêuticas e odontológicas, com ação anticariogênica e poder adoçante semelhante ao da sacarose e superior ao de polióis comuns, além de ter valor calórico reduzido.

A produção em larga escala da enzima XR, bem como a sua aplicação industrial para a fabricação de xilitol e outros bioprodutos de valor agregado, tem sido limitado devido ao alto preço da xilose comercial (RAFIQUL *et al.*, 2014a). Este problema tem incentivado aos pesquisadores a trabalhar para o desenvolvimento de melhores técnicas para reduzir os custos de obtenção da XR como, por exemplo, a busca por novas fontes de matéria-prima e condições do processo.

Neste contexto, os materiais lignocelulósicos são considerados como perspectiva para aplicação em bioprocessos. Há grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos sendo acumulados anualmente, decorrentes da produção agrícola, entre outros fatores que operam esses recursos naturais. O grande acúmulo desses resíduos desencadeia uma série de problemas. Há o desequilíbrio do meio ambiente, ocasionado pela decomposição desse material, além do fator econômico devido à degradação desses resíduos apresentarem a perda de potenciais recursos energéticos (MICHEL, 2007). Um material lignocelulósico que vêm ganhando destaque é o bagaço de caju.

No Brasil, a região nordeste do estado do Ceará é a maior produtora nacional de caju, que tem como subproduto da extração do seu suco o bagaço de caju, uma das maiores fontes de resíduos da indústria agrônômica do setor apresentando, aproximadamente, 20 % do peso total do pedúnculo (ROCHA *et al.*, 2011).

A composição do bagaço de caju (BC) é celulose, hemicelulose e lignina (ROCHA *et al.*, 2014), que pode fornecer uma quantidade considerável de açúcares fermentescíveis tais como glucose e xilose para a produção biotecnológica de etanol e xilitol, respectivamente (ROCHA *et al.*, 2011; ALBUQUERQUE, 2015). Devido suas características, este material lignocelulósico poderá ser utilizado na produção da enzima xilose redutase por processo biotecnológico, sendo a *Candida* o principal gênero de levedura avaliada para a produção de xilose redutase e xilitol.

O Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Bioprocessos – GPBio desenvolveu diversos estudos utilizando o bagaço de caju como matéria-prima na produção de etanol (ROCHA *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2015), na produção de xilitol (ALBUQUERQUE, 2015) e estes estudos contribuíram de forma direta para o tema proposto nesta dissertação.

Neste contexto, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a produção da enzima xilose redutase e xilitol através de processos biotecnológicos utilizando a levedura *Candida tropicalis* ATCC750 e hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju.

### **Objetivo Geral**

Avaliação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju para a produção da enzima xilose redutase (XR) e de xilitol por *Candida tropicalis* ATCC750.

### **Objetivos Específicos**

- Obtenção e caracterização química do hidrolisado do bagaço de caju;
- Estudo da influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase e de xilitol utilizando o meio formulado;
- Estudo da influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase e de xilitol utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju;
- Avaliar a concentração inicial de xilose na produção de xilose redutase e de xilitol utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju;
- Caracterização parcial da enzima xilose redutase.

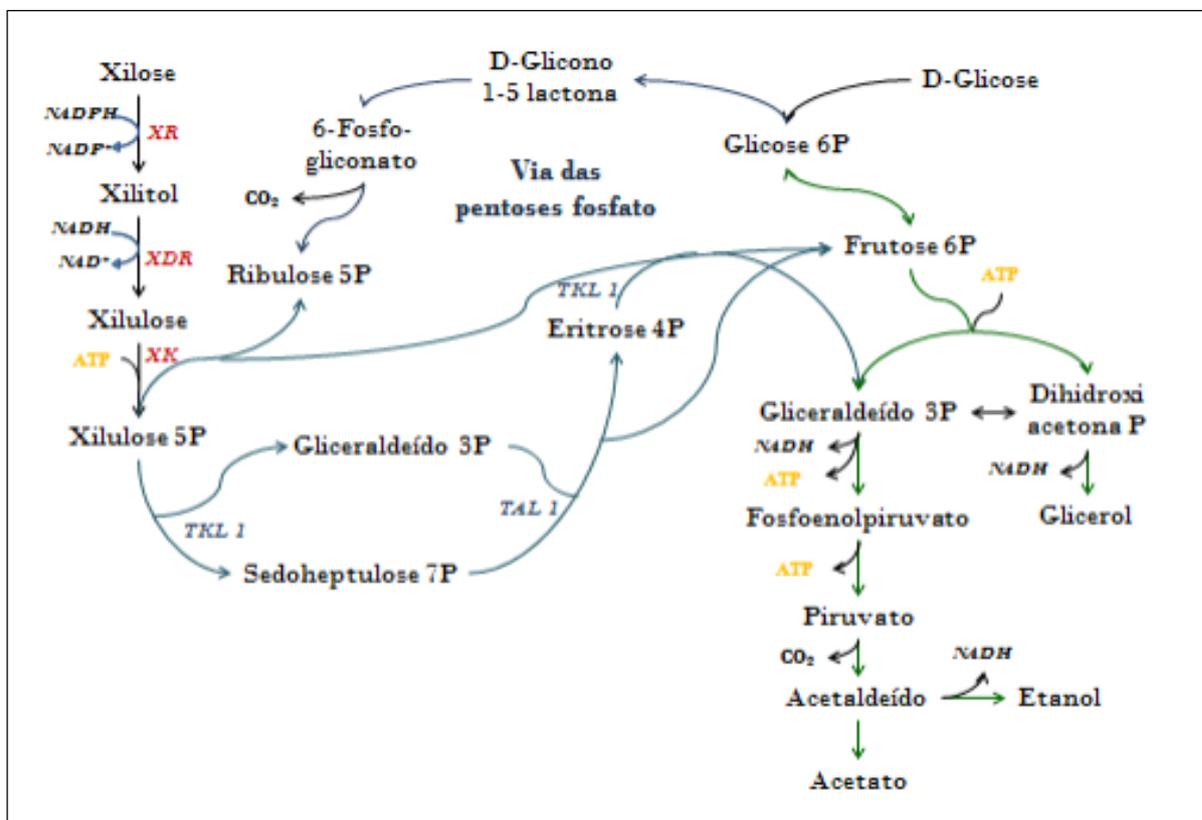
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Enzima xilose redutase (XR)

A xilose redutase (XR) é uma enzima oxido redutase, pertencente ao membro da família de enzimas da aldose-redutase (EC 1.1.1.21), geralmente encontrados em fungos e leveduras. É no citoplasma de micróbios que assimilam à xilose que ocorre esta enzima intracelular, na qual dá início ao processo do metabolismo da xilose por reduzir a xilose a xilitol (RAFIQUL e SAKINAH, 2014b).

Esse processo é feito através da redução aberta da cadeia xilose a xilitol, onde é reoxidado em xilulose por xilitol desidrogenase e integrado metabolicamente por meio da via da pentose fosfato (JEFFRIES, 2006), conforme apresentado no fluxo metabólico ilustrado a seguir na Figura 1.

**Figura 1:** Esquema ilustrativo da via metabólica da xilose e glicose.



Fonte: JEFFRIES, 2006.

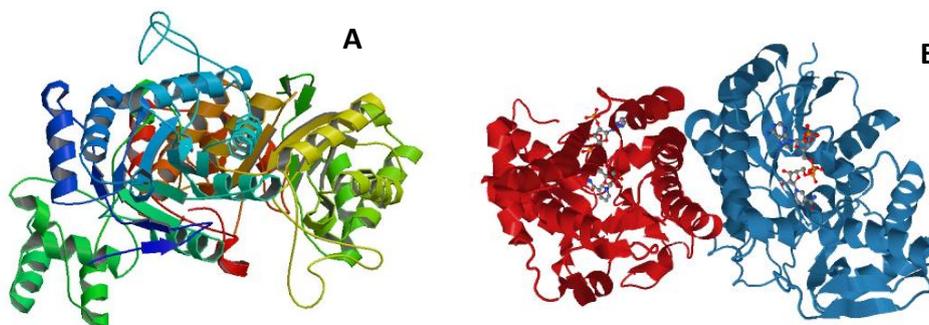
É importante o estudo das leveduras que são capazes de fermentar xilose, realizando a caracterização das enzimas que participam da via metabólica deste açúcar. Nas leveduras, fungos filamentosos e em outros eucariontes o metabolismo da xilose procede de acordo com o processo de redução e oxidação, que são mediados pela xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), em que transformam a xilose em xilitol e, em seguida, em xilulose. Com isso, a xilulose entra para a via da pentose fosfato (PF) por meio da xilulose, que através da xiluloquinase (XK) é fosforilada a xululose-5P (JEFFRIES, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2014), conforme fluxo metabólico simplificado apresentados na Figura 1.

A via da pentose fosfato é considerada como tendo duas fases. A primeira fase, oxidativa, converte a hexose, glicose 6P, para pentose ribulose-5P, mais  $\text{CO}_2$  e NADPH. Já a fase não oxidativa converte ribulose-5P em ribose 5-P, xilulose-5P, sedoheptulose 7P e eritrose 4P, que através da frutose-6P e gliceraldeído-3P, retornam os carbonos para a glicólise, permitindo assim a posterior fermentação do açúcar (MOURO, 2002).

A enzima xilose redutase de algumas leveduras demonstra uma relativa dependência pelo cofator NADPH, onde é liberado  $\text{NADP}^+$ , enquanto outras podem ter atividade tanto com NADPH como NADH, em que é liberado tanto  $\text{NADP}^+$  como  $\text{NAD}^+$ , respectivamente (JEFFRIES & ALEXANDER, 1990), sendo depende da sua estrutura.

A Figura 2 representa a estrutura da xilose redutase (XR) a partir da *Candida tenuis*, um membro da família estruturalmente caracterizada (KAVANAGH et al., 2002).

**Figura 2:** Estrutura da holoenzima dimérica xilose redutase de *Candida tenuis*. (A) Estrutura completa e (B) estrutura apresentada pelos dímeros.



**Fonte:** Kavanagh et al., 2002.

As aplicações da XR são generalizadas na produção biológica de xilitol, etanol e sorbitol através da xilose, tornando a enzima de grande interesse. Sendo o uso comercial de xilose de preço elevado, a produção em larga escala de XR torna-se limitada como a sua aplicação em indústrias para a produção de xilitol e outros bioprodutos de valor acrescentado (RAFIQUL *et al.*, 2015).

O processo enzimático tem sido de grande interesse para os cientistas por tratar de uma alternativa ao processo biotecnológico, onde pode ser alcançado uma conversão de até 100 % de xilose em xilitol. Essa redução direta de xilose em xilitol por meio da enzima xilose redutase (XR) é assistida pela coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) (BRANCO *et al.*, 2011).

### **2.1.1 Processos de produção da enzima xilose redutase (XR)**

A xilose redutase (XR) não se encontra comercialmente disponível devido ao custo do processo, apesar da vasta literatura sobre a utilização desta enzima (RAFIQUL *et al.*, 2014a). Com esse alto valor para a preparação da XR, muitos autores têm pesquisado para o desenvolvimento de melhores técnicas para reduzir esse custo. Sendo assim, um processo economicamente interessante é a utilização de hidrolisado lignocelulósico como uma fonte de carbono para a preparação de XR a partir de leveduras.

A fração hemicelulósica de HBCD (hidrolisado do bagaço de caju com pH ajustado e tratado com carvão) é facilmente hidrolisada por ácido diluído para produzir hidrolisado hemicelulósico (HBCD) rico em xilose, para então ser utilizado como um substrato potencial para o crescimento microbiano. O uso de HBCD como uma fonte de carbono para o crescimento de micro-organismo tem grandes vantagens, como a redução de xilose comercial e a preparação da enzima XR industrialmente importante para a economia do bioprocessos.

Neste trabalho, a enzima XR é preparada a partir da estirpe *C. tropicalis*, cultivada em meio à base do hidrolisado HBCD e adquirida através do rompimento celular de ultrassom, onde o seu processo de extração é baseado na metodologia descrita por Freitas (2013) e Rafiqul e Sakinah (2014b). A XR isolada é determinada de acordo com a atividade da enzima e sua caracterização é feita através do estudo do pH ótimo e temperatura ótima, segundo a metodologia descrita por Yokoyama *et al.* (1995) e Rafiqul e Sakinah (2014b).

Estudos determinaram que a redução de xilose em xilitol por XR depende do tipo e concentração de substrato, assim como as condições de funcionamento experimentais. O pH da reação, por exemplo, é considerado como sendo um parâmetro que afeta o potencial de ionização de grupos funcionais sobre a enzima (NIDETZKY *et al.*, 2003).

Rafiqul *et al.* (2014a), por exemplo, estudou a produção da enzima xilose redutase através de serragem da madeira *Meranti*, utilizando a levedura *Candida tropicalis*. O processo fermentativo adaptado da *C. tropicalis* foi realizado a 30 °C e 150 rpm. A melhor temperatura da atividade da XR foi encontrada a 25 °C, e pH ótimo a 7,0, sendo a XR da *C. tropicalis* específica para NADPH como coenzima com atividade 11,16 U.mL<sup>-1</sup>.

## **2.2 Aplicação da enzima xilose redutase: produção de xilitol**

O xilitol é um adoçante natural que pode ser encontrado nas fibras de muitos vegetais, algas, líquens, cogumelos, frutas e legumes, além de ser um intermediário para o metabolismo humano (LIMA, 2006; MICHEL, 2007).

Tem dulçor semelhante ao da sacarose, mas na dieta possui muito menos calorias. Foi identificado como um dos 12 constituintes químicos de grande importância em uma lista de mais de 300, segundo o Departamento de Energia dos EUA (DOE), podendo ser produzido através da biomassa (WERPY *et al.*, 2004; GRANSTRÖM, IZUMORI e LEISOLA, 2007)

As principais aplicações de xilitol são em produtos odontológicos e alimentícios. Ele tem apresentado eficiência no tratamento de diversas doenças como: diabetes (ISLAM, 2011), osteoporose (MATTILA, 2005), anemia (WANG *et al.*, 1971) e infecções respiratórias (DURAIRAJ *et al.*, 2007), citados por ALBUQUERQUE *et al.*, 2014.

Uma grande característica que o xilitol apresenta é seu alto poder de refrescância, que é bastante encontrada em produtos alimentícios, como em gomas de mascar e balas. A característica dessa sensação de refrescância é devido o seu alto calor de dissolução (34,8 cal.g<sup>-1</sup>), tornando-o de maior refrescância bucal entre os polióis (MUSSATO e ROBERTO, 2002).

As pesquisas atuais na produção do xilitol fermentativo está diretamente relacionada com o desenvolvimento dos micro-organismos a partir da utilização de hidrolisado hemicelulósico capazes de liberar D-xilose disponível e convertê-lo em xilitol por meio da enzima xilose redutase (XR). A abordagem enzimática para a produção de xilitol a partir de xilose pode apontar uma alternativa para o processo químico. Além disso, este método é considerado seguro e favorável ao meio ambiente devido a produção de xilitol ser capaz de ser alcançada sem a utilização de altas temperaturas, a pressão, ou purificação de xilose (NIDETZKY *et al.*, 1996).

### 2.2.1 Propriedades e aplicações do xilitol

Emil Fisher e sua equipe foram os pioneiros na sintetização e descrição do xilitol considerando, em 1991, como um composto orgânico com fórmula molecular representada por  $C_5H_{12}O_5$  (penta-hidroxi-pentano), além de um cristal branco rômico e altamente solúvel quando em contato com a água. Promove um prazeroso efeito refrescante devido ao seu calor de dissolução ( $34,8 \text{ cal.g}^{-1}$  – endotérmico), tornando-o adequado para uso em gomas de mascar, com um poder adoçante semelhante ao da sacarose. Os mamíferos o produzem em pequena quantidade, sendo considerado como intermediário no metabolismo de carboidratos (MAIA *et al.*, 2008). Devido à estabilidade física e biológica do xilitol, ele torna-se adequado nas aplicações alimentícias e farmacêuticas (MUSSATO e ROBERTO, 2002).

Há diversos produtos encontrados no mercado que contém xilitol na sua formulação como, por exemplo, gomas de mascar, pastilhas, cremes dentais, entre outros. Alguns exemplos estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Produtos que possuem xilitol na formulação

Produto	Fabricante	Categoria	Teor de xilitol
Xylitol Plus Stevia Packets	Now Foods	Alimentício (Adoçante)	95,5%; 129g/135g
Xylitol Sweetened Gum	Epic Dental	Alimentício (Goma de mascar)	4%; 1,06 g/26,5 g
Trident Xtra Care	Adams	Alimentício (Goma de mascar)	9,3%; 0,14g/1,5g
XyliWhite Toothpaste Gel	Now Foods	Odontológico (Creme dental)	25%; 45,3g/181g
Xlear Sinus Care	Xlera Inc.	Spray nasal/Homeopático	5%; 45mL

Fonte: Autoria própria

São muitas as características que fazem do xilitol um produto de valor comercial e de grande interesse. O xilitol é considerado como um edulcorante alternativo, podendo ser ingerido por diabéticos e também como preventivo de cáries dentárias (WINKELHAUSEN *et al.*, 2007), além de também ser indicado para pacientes portadores de deficiência da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (BAR, 1991).

De acordo com diversos estudos, o consumo regular de chicletes contendo xilitol é capaz de reduzir a incidência de cáries. Esses efeitos anticariogênicos impulsionam o uso de xilitol em cremes dentais, gomas de mascar, pastilhas e outros produtos capazes de controlar e prevenir as cáries (LEE, 2011).

### 2.2.2 Processos de produção de xilitol

O processo de produção do xilitol pode ser realizado através de três procedimentos: o químico, através de redução química de xilose por meio de reações de hidrogenação; via microbiológica, onde há a conversão por micro-organismos que são responsáveis em converter xilose em xilitol e a via enzimática, que vem sendo estudada para a produção de xilitol por meio da enzima xilose redutase (XR) (PAL *et al.*, 2013).

**Tabela 2:** Algumas vantagens e desvantagens dos processos de produção do xilitol

Tipos de processos	Vantagens	Desvantagens
Químico	Otimizado Maior produtividade	Alto custo Uso de recursos naturais
Microbiológico	Menor custo Sustentável Maior eficiência	Baixa produtividade
Enzimático	Sustentável Máxima eficiência Maior produtividade	Custo*

\*Por ser um processo novo ainda não temos análise de custos

**Fonte:** Branco (2010).

O processo químico apresenta alto custo e necessita de muita energia, além de representar grandes riscos ambientais, pois é conduzida a alta temperatura e pressão, e usa catalisador de níquel (RAFIQUL e SAKINAH 2014b; ALBUQUERQUE *et al.*,

2014), encarecendo o valor do produto devido, principalmente, aos extensos processos de separação e de purificação (MISRA *et al.*, 2013).

O xilitol é considerado como um dos doze produtos de alto valor que podem ser fabricados a partir de materiais lignocelulósicos. RAFIQUUL *et al.* (2015) avaliaram a produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de serragem de madeira por xilose redutase, utilizando a *Candida tropicalis* IFO 0618, com rendimento de xilitol obtido de 56 % nas condições ótimas de 30 °C e pH 7.0.

A Tabela 2 apresenta as vantagens e desvantagens dos processos de produção de xilitol. A principal vantagem encontrada no processo microbiano em relação ao químico é o seu custo mais baixo por não necessitar de uma extensa purificação da xilose. Dentro deste contexto, a produção de xilitol através do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju, torna-se uma alternativa economicamente viável para esse processo produtivo.

Uma dificuldade comumente associada com a biotransformação eficiente de xilose é que o hidrolisado contém vários subprodutos (por exemplo, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural) que são inibidores para os organismos (MISRA *et al.*, 2013). Misra *et al.* (2013) demonstraram que a adaptação de células de levedura para hidrolisado hemicelulósico é uma técnica eficaz e de baixo custo para avaliar os efeitos inibitórios dos componentes tóxicos na conversão de xilose a xilitol.

### **2.3 Matérias-primas lignocelulósicas**

A maior parte do constituinte de biomassa terrestre é a lignocelulose, correspondendo a cerca da metade do material vegetal que se produz pela fotossíntese (PÉREZ *et al.*, 2002). Atualmente, em processos biotecnológicos, vêm sendo estudado o uso de materiais lignocelulósicos como matéria-prima em bioprocessos. Estes materiais lignocelulósicos apresentam uma ampla capacidade de uso como substrato em processos industriais, na produção de insumos químicos, de alimentos, enzimas e diversos bens de consumo (LATIF; RAJOCA, 2011).

De maneira geral, os materiais lignocelulósicos são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina, definindo a estrutura da maioria dos vegetais onde se encontram associados em uma complexa estrutura. De acordo com a natureza dos vegetais, há uma variação na composição desses constituintes. O maior componente é a celulose (35 – 50 %), seguido da hemicelulose (20 – 35%) e depois tem-se a lignina (10 - 35%). Além destes compostos, proteínas, gorduras e cinzas também fazem parte de uma fração do

material lignocelulósico (CORREIA, 2013). A Tabela 3 mostra a composição lignocelulósica de alguns materiais, podendo ser observado que há diferença na composição entre eles. Essa composição pode variar de acordo com a natureza genética de cada material e das influências ambientais e suas interações (BALAT, 2011).

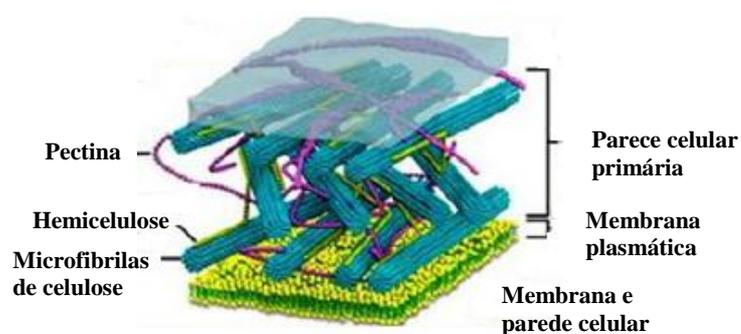
**Tabela 3:** Composição de alguns materiais lignocelulósicos

Materiais Lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço de caju	20,56	10,17	35,26
Bagaço de cana-de-açúcar	25	25 - 50	10 - 30
Palha de trigo	30 - 38	21 - 50	20 - 23,4
Palha de arroz	35 - 41	14,8 - 25	9,9 - 12
Casca de arroz	36,1	14	19,4
Palha de milho	36,8 - 39	14,8 - 25	15,1 - 23,1
Sabugo de milho	45	35	15

Fonte: Correia (2013).

A Figura 3 representa a célula vegetal, que é revestida por lignina e hemicelulose que são responsáveis por proteger a celulose contra a degradação por agentes externos (KESHWANI, 2009). Esses componentes são fortemente entrelaçados e ligados quimicamente por forças não covalentes e por ligações cruzadas covalentes (PÉREZ *et al.*, 2002).

**Figura 3:** Estrutura da parede celular dos vegetais.



Fonte: Sobiologia (2012).

### 2.3.1 *Celulose*

A celulose é considerada o material orgânico de maior abundância na terra, além de ser o principal componente da parede celular da fibra vegetal. É um homopolissacarídeo linear constituído por unidades de D-glicose, com grau de polimerização que varia de 1000 até 5.000 unidades, dependendo da origem da planta (KESHWANI, 2009).

Há vários métodos de pré-tratamento que destroem as paredes celulares expondo os polímeros de açúcares. Na hidrólise ácida da celulose, por exemplo, a celulose é hidrolisada, obtendo-se glicose, um carboidrato que pode ser usado para posterior produção de diversos produtos com valor agregado, por exemplo, etanol (ROCHA *et al.*, 2011).

### 2.3.2 *Hemicelulose*

A hemicelulose é considerada um heteropolímero menor que a celulose, possuindo grau de polimerização entre 100 e 200, além de ramificações com diversos carboidratos como a arabinose, xilose, galactose, manose, além de ácidos urônicos (STAMBUK *et al.*, 2008). Diferente da celulose, sua estrutura pode variar, assim como sua organização estrutural e composição. Apresenta baixa cristalinidade em relação à celulose, sendo hidrolisada com mais facilidade, como resultado da interação entre os diferentes açúcares (SAHA, 2003).

Com a técnica da hidrólise ácida diluída, há a liberação das hexoses (manose, galactose e outros) e pentoses (xilose e arabinose) constituintes da hemicelulose. Sendo a xilose considerada como o segundo açúcar mais abundante na bioesfera, tem-se que os hidrolisados obtidos por essa técnica acabam se caracterizando por apresentarem a xilose como componente majoritário (MICHEL, 2007). Então, os hidrolisados hemicelulósicos utilizados em processos biotecnológicos tornam-se ideais para a produção de diversos produtos, dentre eles pode ser destacado da enzima xilose redutase e do xilitol.

### 2.3.3 Lignina

A lignina é outro importante constituinte lignocelulósico que possui a principal função de dar sustentação a toda estrutura desse material. Este composto está associada às polioses ao longo de ligações covalentes e interações físicas através da parede celular (READING *et al.*, 2003).

As ligninas são consideradas polímeros altamente condensados e compostos por sub-unidades de álcoois p-hidroxifenil (p-coumarico), coniferil (referente as unidades de guaiacil) e sinapil (referentes a unidades siringil) (HATFIELD *et al.*, 1999).

A utilização desses materiais lignocelulósicos, especialmente a celulose e a hemicelulose, presentes no hidrolisado do bagaço de caju representam uma importante e barata fonte de substratos. A fração hemicelulósica, por exemplo, pode ser hidrolisada a xilose e, em seguida, ser fermentada a xilitol (ZOU *et al.*, 2010).

Existem muitos trabalhos na literatura que utilizam diversos materiais lignocelulósicos para a obtenção de xilitol através do hidrolisado hemicelulósico. O bagaço de caju é um exemplo desses materiais, que foi estudado por Albuquerque (2015) para a produção de xilitol, sendo considerado como uma ótima fonte para essa produção.

## 2.4 Bagaço de caju como matéria-prima

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é uma planta tropical encontrada em abundância em quase todo o território do Brasil. A região considerada como maior produtora do caju é a Região Nordeste, com mais de 95 % da produção nacional, tendo como principais produtores os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia e Piauí (SOUZA, 2002).

O maior aproveitamento industrial do caju tem como principal objetivo a colheita da castanha, que é o verdadeiro fruto do caju de onde é extraída a amêndoa com, aproximadamente, 2,5 a 3,0 cm de comprimento e 2,5 cm de largura. Apesar da tentativa de utilização do pedúnculo, seja através de doces, farinhas, sucos e fermentados, apenas 15 % de sua produção é aproveitada (PINHO, 2009).

Ainda no Nordeste do Brasil existe um grande número de indústrias de beneficiamento devido um apoio no incentivo da fruticultura irrigada. Com isso, há uma ampla concentração de subprodutos derivados como consequência do processamento de

sucos tropicais, ocupando um espaço de destaque como resíduos da indústria de beneficiamento de caju (PORTUGAL, 2002).

O bagaço de caju (BC), composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, uma biomassa lignocelulósica, representa uma importante fonte de matéria-prima renovável de baixo custo e grande abundância (BRIONES, SERRANO e LABIDI, 2012).

Existem trabalhos que utilizam o bagaço de caju como matéria-prima para a produção de bioprodutos como, para a produção de etanol por Rocha *et al.* (2009), Correia *et al.* (2013) e Rodrigues *et al.* (2011), produção da enzima tanase (RODRIGUES *et al.*, 2008) e produção de xilitol por Albuquerque *et al.* (2014).

No entanto, o foco deste trabalho foi o estudo da produção da enzima xilose redutase, já que na literatura não foi localizado estudos relacionados à produção desta enzima, utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

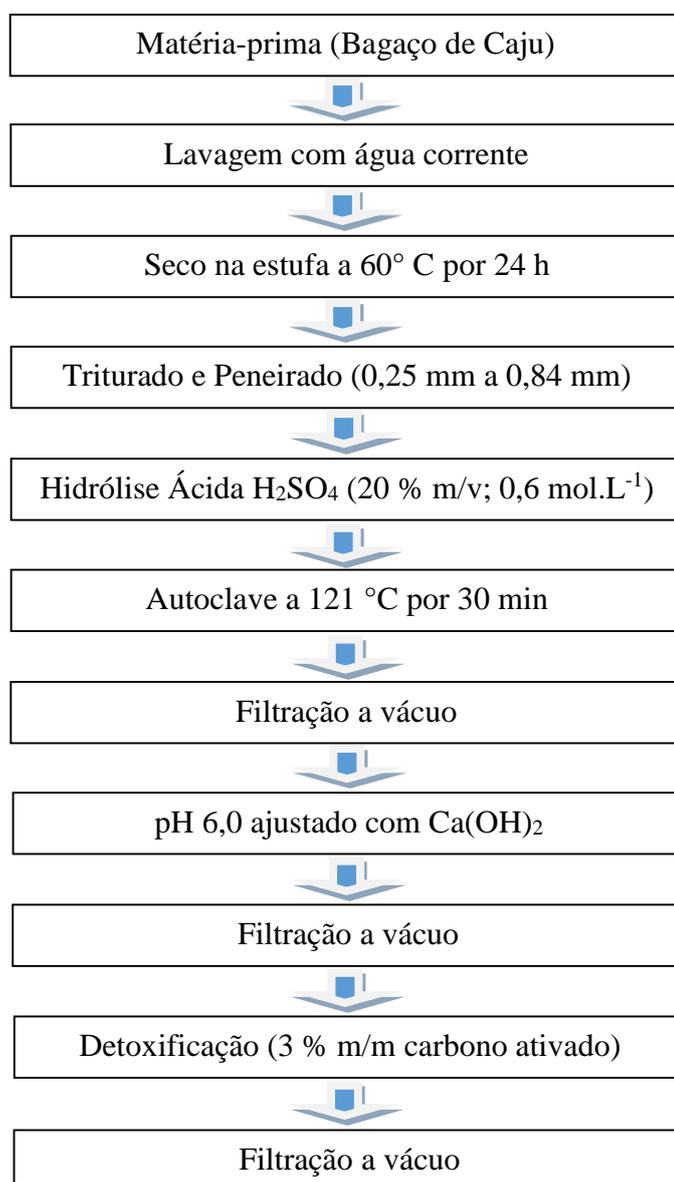
#### 3.1 Bagaço de Caju

O bagaço de caju (BC) utilizado nesta pesquisa foi gentilmente fornecido pela Indústria de Processamento de Sucos Jandaia ® no estado do Ceará, Brasil.

#### 3.2 Hidrólise ácida do bagaço de caju: obtenção do hidrolisado hemicelulósico

A Figura 4 representa toda a etapa desde o tratamento até o processo de hidrólise ácida do bagaço do bagaço de caju para seu uso posterior.

**Figura 4:** Fluxograma do pré-tratamento e processo de hidrólise ácida do bagaço de caju.



O bagaço foi lavado três vezes com água, seco a 60 °C durante 24 h, triturado e peneirado, selecionando-se partículas que ficaram retidas entre as peneiras de Mesh 20-80 (0,25 mm a 0,84 mm). Logo após, o bagaço de caju passou por hidrólise ácida H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 % m/v; 0,6 mol.L<sup>-1</sup>), onde seguiu para autoclave a 121 °C por 30 min, foi caracterizado quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, seguindo a metodologia de Rocha *et al.* (1997) e validada por Gouveia *et al.* (2009). A seguir, foi filtrado e ajustado o pH (6.0) com Ca(OH)<sub>2</sub>, filtrado novamente para a retirada do precipitado formado. A seguir, o meio foi tratado com carbono ativado e filtrado novamente até a obtenção do hidrolisado hemicelulósico (HBCD) para uso posterior como meio de fermentação.

### **3.3 Processo de detoxificação do hidrolisado de bagaço de caju**

Como meio de evitar inibidores microbianos como, por exemplo, furfural, hidrometilfurfural e ácido acético, o hidrolisado do BC passou por um processo de detoxificação usando carbono ativado no processo. Foi usado a concentração de 3 % m/m de carbono ativado em grânulos de origem natural, mantidos a 200 rpm durante 2 h e 30 °C. O bagaço de caju com pH ajustado (pH 6.0) e após passar pelo processo de detoxificação (nomeado de HBCD) foi então utilizado como meio para o processo fermentativo.

### **3.4 Micro-organismo *Candida tropicalis* ATCC750**

O micro-organismo utilizado para a produção da enzima xilose redutase e xilitol foi a levedura *Candida tropicalis* ATCC750, adquirida da Fundação André Tosellos (FAT), Campinas, São Paulo, Brasil.

#### **3.4.1 Armazenamento do micro-organismo**

O armazenamento da cultura foi em meio Ágar YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) em tubos inclinados contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de D (+) glucose anidra (dextrose), 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona bacteriológica, 1 g.L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio mono-hidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e 20 g.L<sup>-1</sup> de ágar dissolvidos em água, esterilizados a 121 °C durante

15 min e mantidos a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, a levedura *Candida tropicalis* ATCC750, foi replicada em placas de Petri que continha o meio Ágar YEPD, sendo incubada a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h em estufa microbiológica.

### 3.5 Preparação do inóculo do micro-organismo

Dois meios de inóculo foram estudados baseados no meio de produção: meio formulado (MF) e meio hidrolisado (HBCD). No meio formulado (MF) foi adicionado  $3\text{ g.L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $3\text{ g.L}^{-1}$  de fosfato de potássio dibásico anidro P.A. ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ),  $1\text{ g.L}^{-1}$  de sulfato de magnésio mono-hidratado ( $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ) e  $18,8\text{ g.L}^{-1}$  de xilose, esterilizados a  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min. O meio de inóculo do hidrolisado hemicelulósico (HBCD) foi suplementado com  $3\text{ g.L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $3\text{ g.L}^{-1}$  de fosfato de potássio dibásico anidro P.A. ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ),  $1\text{ g.L}^{-1}$  de sulfato de magnésio mono-hidratado ( $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ), esterilizado a  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min.

Após o crescimento em placa Petri, três alças de células foram transferidas para 100 mL de meio de inóculo do meio formulado (MF) e três alças de células para 100 mL de meio de inóculo do meio hidrolisado (HBCD), ambos contidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL, funcionando como o meio de adaptação das células para, posteriormente, serem transferidas para os seus respectivos meios de produção.

O inóculo foi incubado em agitador orbital (Tecnal, TE-420, SP-Brasil) a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Após 24 h, o meio foi centrifugado (Refrigerated Centrifuge MOD.280 R, FANEM-SP-Brasil) a 6.000 rpm por 15 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para obter células para os ensaios de produção.

### 3.6 Processo fermentativo para a produção da enzima xilose redutase

Nesta etapa, avaliou-se a produção da enzima xilose redutase e do xilitol por *Candida tropicalis* ATCC750 em batelada. Foram avaliados dois meios de produção, meio formulado (MF) e o meio de hidrolisado hemicelulósico (HBCD). A concentração inicial de células utilizadas foi  $0,3 \pm 0,1\text{ g.L}^{-1}$  de células secas, sendo transferidas para 100 mL de meio de produção (em Erlenmeyer de 250 mL) e incubadas sob agitação de 150 rpm em agitador orbital (Tecnal, TE-420, SP-Brasil) a diferentes temperaturas. Durante o processo de produção, foi avaliado o pH e coletadas amostras do meio de

cultivo e submetidas as análises do teor de açúcares, atividade enzimática, concentração de biomassa e concentração de xilitol. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

### **3.6.1 *Estudo da influência da temperatura***

Foi avaliado a influência da temperatura na produção de xilose redutase e xilitol utilizando os meios MF e HBCD, sendo o processo conduzido conforme citado anteriormente nas temperaturas de 25 °C, 30 °C, 35 °C e 45 °C.

### **3.6.2 *Estudo da concentração inicial de xilose***

Foram estudados três diferentes concentrações da xilose em meio HBCD, onde foram adicionados em cada meio as quantidades de 0 g.L<sup>-1</sup>, 20 g.L<sup>-1</sup> e 40 g.L<sup>-1</sup> de xilose, suplementado com de 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 3 g.L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio dibásico anidro P.A. (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 1 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio mono-hidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), esterilizado a 110 °C por 10 min. Durante o processo de produção, foi avaliado o pH e coletadas amostras do meio de cultivo e submetidas as análises do teor de açúcares, concentração de biomassa e concentração de xilitol. Este ensaio fermentativo de produção foi conduzido a 30 °C sob agitação de 150 rpm em agitador orbital e a concentração inicial de células de 0,3 ± 0,1 g.L<sup>-1</sup>.

## **3.7 *Processo de extração da enzima xilose redutase (XR)***

Após 72 h do processo de produção utilizando os meios MF ou hidrolisado hemicelulósico (HBCD), foram coletadas amostras do caldo cultivado e centrifugadas a 6.000 rpm por 15 min para obter a massa celular, que foi lavada com tampão fosfato de potássio (0,1 M /pH 7,0) na proporção de 1:3 (massa seca: tampão), e centrifugado novamente para, em seguida, romper as células por ultrassom.

O método utilizado para romper as células em suspensão foi o método físico, segundo a metodologia descrita por Freitas (2013) e RafiquL e Sakinah (2014b), no qual a suspensão celular foi submetida à ruptura através de ponteira ultrassônica (Qsonica Sonicators-EUA) usando sonicação a 20 kHz, amplitude 40%, com ciclos de 5 min por 15 min (pulse de 5s), em seguida, a solução foi centrifugada nas condições já citadas para se obter o extrato enzimático. Durante o rompimento celular, a solução foi mantida

em baixa temperatura (mergulhada em banho de gelo) durante todo o procedimento. Após toda a operação, o sobrenadante foi armazenado a - 4 °C e utilizado como extrato bruto de enzima.

### 3.8 Determinação da atividade enzimática da xilose redutase (XR)

A atividade da enzima XR foi determinada baseando na quantidade de NADPH oxidado durante o procedimento, assim como a redução de xilose a xilitol a uma temperatura fixa, de acordo com a metodologia de Yokoyama *et al.* (1995) e Rafiquil e Sakinah (2014 b) com modificação.

O procedimento foi realizado adicionando 1,2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH a ser estudado). Acrescentou-se 0,2 mL 2-mercaptoetanol 0,1 M, seguido de 0,1 mL de extrato bruto de xilose redutase (XR), 0,1 ml de NADPH 3,4 mM. 2-ME foi adicionado na mistura reacional para inibir a atividade de protease, caso esteja presente na mistura reacional ou na XR. Após 1 min em agitação no espectro, adicionou-se 0,2 mL de D-xilose 0,5 M. Para um controle da reação, desnaturou-se a enzima aquecendo-a a 100 % por 10 min. A XR desnaturada foi então utilizada para o controle. A taxa de oxidação do NADPH foi medida a 340 nm por espectroscopia UV-VIS (Thermo Scientific - SP) a intervalos de 1 minuto durante 5 minutos. Uma unidade (U) de XR é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a oxidação de 1 μmol de NADPH por min a pH 7,0 e 25 °C. A atividade de XR foi determinada utilizando a equação proposta por RAFIQUIL *et al.* (2015), na unidade de U.mL<sup>-1</sup> (unidade por mL), conforme Equações 1 e 2.

$$\Delta A_{340/min} f = \frac{(\Delta A_{340} \text{ a } 1 \text{ min}) - (\Delta A_{340} \text{ a } 5 \text{ min})}{4 \text{ min}} \quad (1)$$

$$\text{Atividade Enzimática} = (\Delta A_{340/min}(\text{Teste}) - (\Delta A_{340/min}(\text{Controle}))) * V_a * \frac{DF}{(E^{mM} \times V_e)} \quad (2)$$

sendo:

$\Delta A_{340/min}$  (Teste) = lido no espectro após 1 min;

$\Delta A_{340/min}$  (Controle) = lido no espectro após 5 min;

$V_a$  = 2 mL, que corresponde à soma dos volumes de todas as soluções;

DF = 1

$E^{mM}$  = 6,22 Mm<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

$V_e$  = volume da enzima, 1 mL.

### **3.9 Caracterização da enzima XR produzida**

#### **3.9.1 Estudo do pH ótimo e temperatura ótima da XR**

Foi realizado a caracterização parcial do extrato bruto enzimático, sendo inicialmente analisado o pH em que a enzima obtém uma maior atividade enzimática, denominado pH ótimo, sendo avaliados os pHs 3,0 (tampão acetato), 5,0, 6,0, 8,0 (tampão fosfato de potássio) e 10,0 (tampão carbonato-bicarbonato), fixando a temperatura 25 °C. A temperatura ótima para a atividade de XR foi calculada incubando a mistura de reação a diferentes temperaturas variando de 10 °C a 60 °C a pH 7,0, durante 5 min.

As condições utilizadas foram as mesmas do tópico 6.8 para a determinação da atividade, mudando apenas pH e temperatura no espectro, de acordo com os dados a serem analisados.

#### **3.9.2 Análise de SDS-PAGE de cultura sobrenadante**

As análises dos extratos enzimáticos de XR produzidas utilizando os meios hidrolisado hemicelulósico (HBCD) ou meio formulado (MF) foram realizadas através do equipamento para eletroforese da Bio-Rad-Mini-PROTEAN® TGX™ (SP-Brasil), utilizando gel de separação.

Inicialmente preparou-se o gel para montar o suporte usando 1,25 mL de tampão de separação, 2 mL de acrilamida, 1,72 mL de água destilada, 10 µL de TEMED e 50 µL de APS 10 % (supersulfato de amônia). Após 10 min, preparou-se a outra etapa do processo para concentrar o gel com 750 µL de tampão de concentração, 300 µL de acrilamida 30 %, 1,5 mL de água destilada, 200 µL de bis-acrilamida (2%), 15 µL de APS e 5 µL de TEMED.

Utilizou-se 40 µL das amostras de extrato enzimático com 10 µL de tampão de ruptura para cada análise na eletroforese. As diferentes soluções foram aquecidas a 100 °C por 5 min, onde alíquotas de 10 µL de cada amostra foram inseridas nos poços de gel no tempo de corrida de, aproximadamente 1 h, esperou-se as amostras percorrerem todo o caminho dos poços até atingirem a base do gel. Após esse procedimento, o material em gel foi transferido para um banho com o azul brilhante de Coomassie® (Brilliant Blue G 250 – Vetec Química), até ser possível a visualização das proteínas.

### **3.10 Métodos analíticos**

#### **3.10.1 Determinação da concentração celular**

O crescimento celular (biomassa) foi determinado medindo a densidade óptica das amostras, utilizando o espectrofotômetro de UV-visível (Biochrom Libra S11, SP-Brasil) a 600 nm, e a concentração de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) foi determinada por uma curva de calibração de peso seco ( $\text{g.L}^{-1}$ ) em função da densidade óptica (600 nm).

#### **3.10.2 Determinação de carboidratos, xilitol e etanol**

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, etanol, xilitol e inibidores (ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando o sistema de CLAE (Waters, Milford, MA, EUA). O efluente era  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em água deionizada a uma taxa de fluxo de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ . As amostras foram identificadas por comparação dos tempos de retenção dos carboidratos, o xilitol, os inibidores e os padrões de etanol.

#### **3.10.3 Determinação do teor de proteínas**

A concentração de proteínas foi determinada segundo o método de Bradford (1976). Utilizou-se curva de calibração com padrão soro albumina bovina (BSA), adquirida da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO), válida numa faixa de concentração de  $0 \text{ g.L}^{-1}$  a  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . Os resultados foram calculados através da curva padrão do reagente de Bradford e obtidos em  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

#### **3.10.4 Caracterização do bagaço de caju**

O bagaço de caju (BC) *in natura* e após hidrólise com ácido sulfúrico diluído foram caracterizados quanto à sua composição de celulose, hemicelulose e lignina, de acordo com as metodologias do Laboratório Nacional de Energia Renováveis dos Estados Unidos NREL (National Renewable Energy Laboratory). As análises foram descritas conforme o protocolo NREL/TP-510-42620 (HAMES *et al.*,2008), as análises de extraíves seguiram o protocolo NREL/TP-510-42619 (SLUITER *et al.*,2008a), a

determinação de sólidos totais e cinzas segundo NREL/TP-510-42621 (SLUITER *et al.*, 2008b), e a análise estrutural de carboidratos e lignina foi utilizado o protocolo NREL/TP-510-42618 (SLUITER *et al.*, 2008c).

#### 3.10.4.1 Determinação de sólidos totais

Para a determinação do teor de sólidos totais, tomou-se como base a metodologia do National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42621 (SLUITER *et al.*, 2008 b). Foram adicionados 0,5 g de bagaço de caju em cadinhos de 25 mL, previamente pesados, onde foram levados para estufa (Tecnal TE-394/1-SP-Brasil) a 105 °C por 4 h. Decorrido esse período, o material foi transferido para um dessecador onde esfriou à temperatura ambiente por 1 h para, em seguida, serem pesados. A amostra foi adicionada novamente em estufa a 105 °C até atingir peso constante. Determinou-se a percentagem de sólidos totais de acordo com a Equação 3.

$$\% \text{ Sólidos Totais} = 1 - \left( \frac{m_{\text{ÚMIDA}} - m_{\text{SECA}}}{m_{\text{ÚMIDA}}} \right) * 100 \quad (3)$$

#### 3.10.4.2 Determinação de extraíveis

Determinou-se a percentagem dos extraíveis do material lignocelulósico usando-se 3 g da amostra adicionada em cartuchos de papel através do método de Sohlex, com extração realizada com 80 mL de etanol 95 % v/v a 80 °C por 8 h, no determinador de óleos e gorduras (Tecnal, TE-044-5/50-SP-Brasil). A seguir, os emboilers, os quais foram previamente pesados, seguiram com o solvente e extrato para estufa com circulação de ar a 60 °C por 24 h. Logo após, foram adicionados ao dessecador durante 1 h à temperatura ambiente para pesagem. Através da Equação 4 foi possível calcular a percentagem de extraíveis no material lignocelulósico.

$$\% \text{ Extraíveis} = \frac{(m_i - m_f)}{ST} * 100 \quad (4)$$

sendo:

$m_i$  = massa inicial do emboiler;

$m_f$  = massa final do emboiler;

ST = percentagem de sólidos totais.

### 3.10.4.2.1 Hidrólise do bagaço com ácido sulfúrico e preparação para análises

Com 1 g da amostra extraída com etanol (conforme procedimento no tópico 6.11.1.2), iniciou-se uma hidrólise ácida do material lignocelulósico, no qual foi adicionado 1 g da amostra em tubos de ensaios de 100 mL rosqueado com tampa e 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72 % (v/v), homogeneizado em vortex por 1 min. A seguir, a amostra passou por um processo de agitação durante 1 h em banho termostatizado (Banho Dudnoff Orbital TE-0532-SP-Brasil) a 30 °C. Após 60 min de hidrólise, o ácido sulfúrico foi diluído com 84 mL de água deionizada. Em seguida, inverteu-se o tubo de ensaio várias vezes para melhor homogeneizar todo o líquido. A hidrólise foi completada em autoclave a 121 °C por 1 h.

Após hidrólise em autoclave, os tubos foram retirados e esperou-se atingir a temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração à vácuo. Depois de filtrado, a parte líquida foi armazenada para análises de açúcares (xilose, glicose e arabinose), ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.10.4.2.2 Lignina insolúvel em ácido (LIA)

O material retido com a lignina insolúvel no funil de separação com placa porosa de número 02, previamente pesado, foi seco em estufa a 105 °C por 4 h. A seguir, esfriou-se o funil com a amostra em dessecador por 1 h e pesou-se levando, em seguida, para estufa a 105 °C até atingir peso constante.

Posteriormente, o funil (com a lignina residual) foi adicionado na mufla a 575 °C por 24 h, seguindo o programa de rampa de temperatura: a partir da temperatura ambiente a 105 °C com posterior aquecimento a 105 °C durante 12 min, rampa de 250 °C a 10 °C/min, rampa de 575 °C a 20 °C/min com aquecimento a 575 °C por 180 min e após resfriamento para 105 °C até as amostras serem removidas para um dessecador, que esfriou-se por 1 h para pesagem do funil mais as cinzas (cinzas insolúveis em ácido).

É denominado RIA, a percentagem de resíduo insolúvel em ácido, onde estão incluídas lignina e cinzas. Já a LIA refere-se à lignina insolúvel. Ambas, RIA e LIA, foram calculadas segundo as Equações 5 e 6, respectivamente:

$$\% \text{ RIA} = \frac{(m_{\text{filtro+resíduo}} - m_{\text{filtro}})}{ST} * 100 \quad (5)$$

$$\% \text{ LIA} = \frac{(m_{\text{filtro+RIA}} - m_{\text{filtro}}) - (m_{\text{filtro+cinza}} - m_{\text{filtro}})}{\text{ST}} * 100 \quad (6)$$

### 3.10.4.2.3 Lignina solúvel em ácido (LSA)

Através de espectrofotometria foi possível determinar a percentagem de lignina solúvel em ácido presente no hidrolisado, de acordo com a Equação 7, utilizando o comprimento de onda de 240 nm, sendo a absorbância do espectrofotômetro zerada com água deionizada.

$$\% \text{ LSA} = \frac{\text{UV}_{\text{abs}} * V_{\text{filtrado}} * f_{\text{D}}}{\text{ST}} * 100 \quad (7)$$

sendo:

$\text{UV}_{\text{abs}}$  = média da absorbância da amostra a 240 nm;

$V_{\text{filtrado}}$  = volume final utilizado na hidrólise;

$f_{\text{D}}$  = fator de diluição utilizado para diluir a solução caso a absorbância seja maior que 1,0;

ST = sólidos totais.

### 3.10.4.3 *Análise dos carboidratos, furfural, hidrometilfurfural e ácidos orgânicos para determinação da celulose e hemicelulose*

Utilizou-se a fração líquida do hidrolisado para analisar os carboidratos, furfural, hidrometilfurfural e ácidos orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando um sistema de CLAE (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414 e com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio Rad, Hercules, CA, EUA). Utilizou-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 Mm em água deionizada com vazão de  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ . Foram construídas curvas de calibração a serem usadas nas concentrações de cada componente, através da relação das concentrações dos padrões com as áreas dos cromatogramas.

A celulose e hemicelulose foram determinadas através das concentrações de carboidratos e ácidos orgânicos obtidos, usando-se fatores de conversão para converter a massa desses compostos em massa de celulose e hemicelulose. Tais fatores baseiam-se na estequiometria de conversão em seus compostos percussores (celulose e

hemicelulose). A percentagem calculada na obtenção da celulose depende de fatores que são 0,95, 0,90, 3,09 e 1,29 para celobiose, glicose, ácido fórmico e hidroximetilfurfural, respectivamente. Para determinar a percentagem de hemicelulose, usou-se os valores de 0,88, 0,88, 1,37 e 0,72 para xilose plus (xilose), arabinose, furfural e ácido acético, respectivamente. As Equações 8 e 9 foram utilizada para a determinação da percentagem de celulose e hemicelulose, respectivamente.

$$\% \text{ Celulose} = \frac{m_{\text{celulose}} * 0,95 + m_{\text{glicose}} * 0,90 + m_{\text{ác.fórmico}} * 3,09 + m_{\text{HMF}} * 1,29}{ST} * 100 \quad (8)$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \frac{m_{\text{xilose}} * 0,88 + m_{\text{arabinose}} * 0,88 + m_{\text{ác.acético}} * 1,37 + m_{\text{furfural}} * 0,72}{ST} \quad (9)$$

Sendo:

$m_{\text{celulose}}$  = massa da celulose;

$m_{\text{glicose}}$  = massa da glicose;

$m_{\text{ác.fórmico}}$  = massa do ácido fórmico;

$m_{\text{HMF}}$  = massa do hidroximentilfurfural;

$m_{\text{xilose}}$  = massa da xilose;

$m_{\text{arabinose}}$  = massa da arabinose;

$m_{\text{ác.acético}}$  = massa do ácido acético;

$m_{\text{furfural}}$  = massa do furfural.

### 3.10.5 Cálculo dos parâmetros cinéticos

Os dados obtidos experimentalmente (concentração de biomassa, substrato e produto) foram utilizados na determinação dos parâmetros de conversão dos bioprocessos.

A produtividade do xilitol ( $Q_{P1}$ ,  $\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ ) foi calculada como a razão da concentração máxima de xilitol obtida ( $P_{1\text{máx}}$ ,  $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) e o tempo de fermentação no qual  $P_{1\text{máx}}$  foi alcançado ( $t$ , h), como apresentado na Equação 10:

$$Q_{P1} = \frac{P_{1\text{máx}}}{t} \quad (10)$$

O rendimento do xilitol foi baseado no consumo de xilose ( $Y_{P/S}$ ) pelo micro-organismo *Candida Tropicalis* ATCC750, e calculado através da Equação 11:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (11)$$

sendo:

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

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

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

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

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

Também determinou-se a velocidade específica de crescimento ( $\mu_X$ ), a velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_S$ ) e velocidade específica de formação de produto ( $\mu_P$ ), através das Equações 12, 13 e 14:

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dT} \quad (12)$$

$$\mu_S = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dT} \quad (13)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dT} \quad (14)$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização do bagaço de caju antes e após hidrólise ácida

Primeiramente, o presente estudo teve por objetivo caracterizar quimicamente o bagaço de caju (BC) e o hidrolisado obtido do processo de hidrólise (concentração de glicose e xilose obtida no licor).

A Tabela 4 apresenta a caracterização composicional do bagaço de caju (BC) *in natura* e após a hidrólise com ácido sulfúrico. O bagaço *in natura* apresentou 19,23 % de celulose, 17,17 % de hemicelulose, 34,77 % de lignina total, 6,52 % de extraíveis (ceras e gorduras), 4,68 % de cinzas e 2,76 % de umidade.

**Tabela 4:** Composição do bagaço de caju *in natura* e após hidrólise com ácido sulfúrico

Constituintes da Biomassa (% m/m)	Bagaço de Caju <i>in natura</i>	Bagaço de Caju após Hidrólise Ácida
Celulose	19,23 ± 0,25	19,01 ± 0,15
Hemicelulose	17,17 ± 0,30	5,40 ± 0,09
Lignina Total	34,77 ± 3,50	62,18 ± 1,36
Extraíveis	6,52 ± 0,10	11,55 ± 0,1
Cinzas	4,68 ± 0,97	1,42 ± 0,17
Umidade	2,76 ± 0,01	2,78 ± 0,01

A hidrólise ácida realizada foi capaz de liberar glicose, xilose e arabinose a partir da celulose e hemicelulose presentes no bagaço de caju. Além disso, compostos inibidores também foram formados durante a hidrólise ácida, como o ácido acético e o ácido fórmico. O hidrolisado do bagaço de caju (HBC) continha 28,57 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 18,30 g.L<sup>-1</sup> de xilose, 11,74 g.L<sup>-1</sup> de arabinose, 6,79 g.L<sup>-1</sup> de celobiose, 1,64 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético e 0,90 g.L<sup>-1</sup> de ácido fórmico (ver Tabela 5). A concentração total de açúcares fermentescíveis obtidos por hidrólise ácida, incluindo glicose, xilose e arabinose foi, aproximadamente, 58,62 g.L<sup>-1</sup>. Assim, HBC mostrou-se favorável para o meio microbiano devido a estas fontes de carbono presentes. De acordo com a literatura, a hidrólise ácida realizada foi eficiente na obtenção dos açúcares de interesse como a

glicose, a xilose e arabinose. Alguns autores realizaram tratamento semelhante e tiveram resultados inferiores ao hidrolisar alguns materiais lignocelulósicos como, Mateo *et al.* (2013) que conseguiu aproximadamente 25 g.L<sup>-1</sup> de xilose, glicose e arabinose através da poda de oliveira. Branco *et al.*, 2011 trabalharam com a hidrólise do bagaço de cana e conseguiu 28,5 g.L<sup>-1</sup> de açúcares fermentescíveis.

**Tabela 5:** Composição elementar do hidrolisado do bagaço de caju sem ajuste do pH, com ajuste do pH e detoxificado.

Composição (g.L <sup>-1</sup> )	HBC	HBC-1	HBCD
Glicose	28,57 ± 0,01	26,17 ± 0,18	27,70 ± 0,15
Xilose	18,30 ± 0,03	17,28 ± 0,05	15,17 ± 0,09
Arabinose	11,74 ± 0,04	11,05 ± 0,14	11,17 ± 0,04
Celobiose	6,79 ± 0,10	4,38 ± 0,03	3,69 ± 0,12
Ácido Acético	1,64 ± 0,04	1,21 ± 0,02	1,19 ± 0,17
Ácido Fórmico	0,90 ± 0,10	0,26 ± 0,10	1,10 ± 0,10
Furfural	n.d.	n.d.	n.d.
HMF	n.d.	n.d.	n.d.

\*HBC: hidrolisado após hidrólise, BCH-1: hidrolisado com ajuste de pH, HBCD: hidrolisado com ajuste de pH e tratado com carvão ativado. \*\*n.d.: Não detectado.

Observou-se que, após o ajuste do pH com Ca(OH)<sub>2</sub>, a quantidade total de monossacarídeos foi um pouco reduzida (58,62 – 54,52 g.L<sup>-1</sup>) no BCH-1. Em relação à xilose, um decréscimo de 1,0 g.L<sup>-1</sup> ocorreu após o ajuste de pH. Esta baixa de açúcares redutores presentes no HBC é um ponto positivo para estabelecer um processo de detoxificação. Além disso, foi observada uma redução no ácido acético e ácido fórmico após o hidrolisado ter o pH ajustado com Ca(OH)<sub>2</sub>.

A alcalinização do HBC (hidrolisado após a hidrólise), que ocorre durante o ajuste de pH, também é considerado um método de detoxificação por tratamento químico com Ca(OH)<sub>2</sub> ou CaO, que consiste em adicionar estes reagentes ao hidrolisado aumentando o seu pH acima de 10, sob condições de temperatura e tempo de reação controlados. Após todo esse processo, o pH da mistura é ajustado ao valor de cultivo do microrganismo com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o precipitado formado é removido por filtração. As

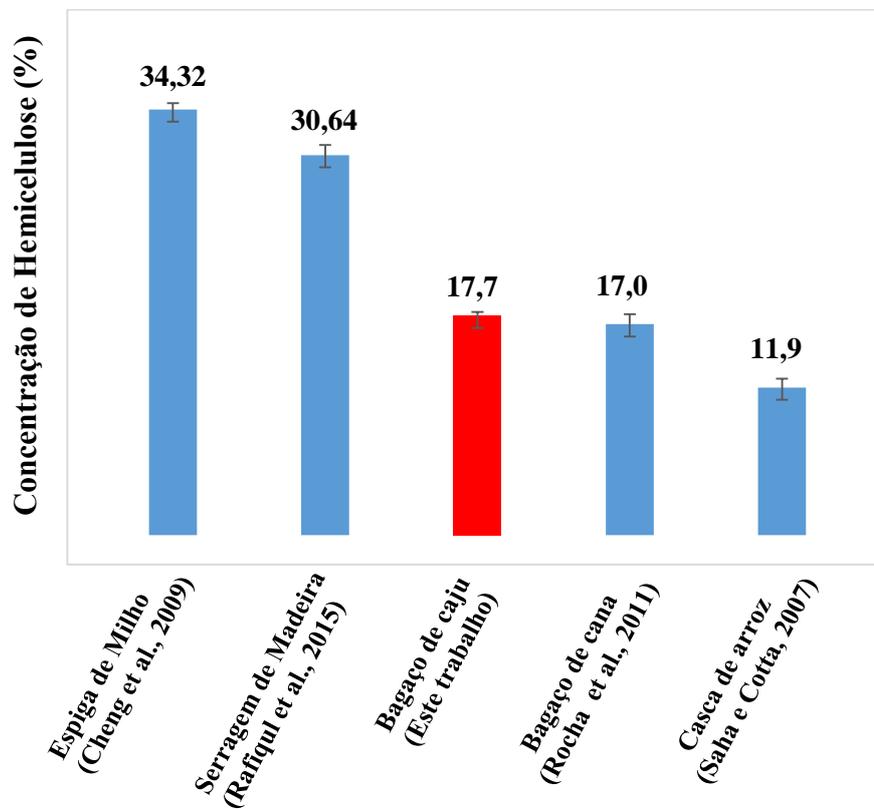
vantagens desse método são: baixo custo, remoção parcial de compostos de ácido acético e fenólicos, precipitação de íons metálicos tóxicos de Fe, Ni, Cr e para conversão de compostos menos tóxicos (tais como ácido furfurílico), metabolizável por fermentação de microrganismos (PARAJÓ *et al.*, 1998).

Após a detoxificação, a composição de HBCD (hidrolisado com ajuste de pH e tratado com carvão ativado) foi de 27,70 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 15,17 g.L<sup>-1</sup> de xilose, 11,17 g.L<sup>-1</sup> de arabinose, 3,69 g.L<sup>-1</sup> de celobiose, 1,19 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético e 1,10 g.L<sup>-1</sup> de ácido fórmico, conforme apresentado na Tabela 5. O processo de detoxificação com carvão ativado não foi eficaz na eliminação do ácido acético e fórmico (hidrolisado HBCD), que apresentam pequena variação em suas concentrações. Contudo, o processo de detoxificação mais adequado visando o processo fermentativo depende do microrganismo utilizado, pois há limites aceitáveis de algumas substâncias para ter um caráter inibidor. O método ideal deve eliminar a maior quantidade de compostos tóxicos e causar menor perda de açúcares fermentescíveis. No entanto, visando um bioprocesso mais eficiente, uma vez avaliados os parâmetros do processo, deve-se analisar a necessidade de reduzir total ou parcialmente os compostos inibidores de acordo com o metabolismo celular da levedura (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

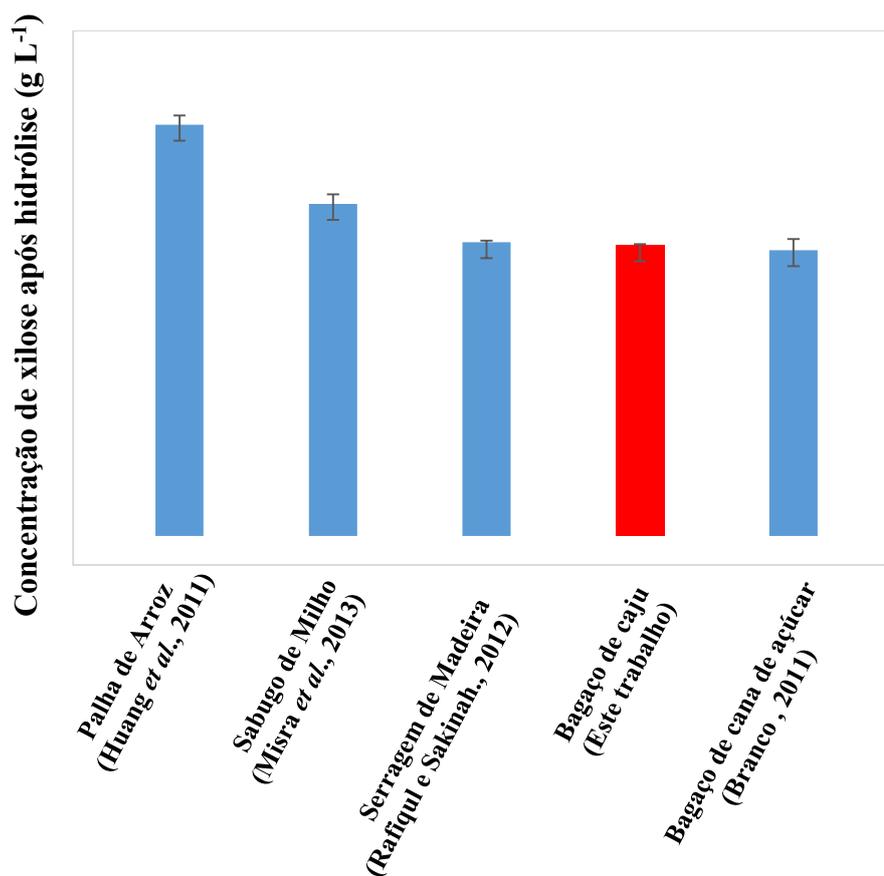
Então, o hidrolisado HBCD foi utilizado como meio de cultivo para avaliação da produção da enzima xilose redutase.

A Figura 5 apresenta o teor de hemicelulose (fração de onde provém a xilose) do bagaço de caju em relação ao de outros resíduos citados na literatura. Cheng *et al.* (2009) relataram uma quantidade de 34,32 % de hemicelulose na composição de espiga de milho, Boussarsae *et al.* (2009) citaram que o bagaço de cana apresentou 26 % de hemicelulose em sua composição e Rocha *et al.* (2011) citaram que o bagaço de cana continha 17 % de hemicelulose. Rafiqul *et al.* (2015) relataram que a serragem de madeira *Meranti* continha em sua composição 30,64 % de hemicelulose. Embora o bagaço de caju apresente um menor teor de hemicelulose em relação a muitos trabalhos da literatura, como apresentado na Figura 5, deve-se considerar que a concentração de xilose do hidrolisado hemicelulósico possui um valor próximo ao de outros trabalhos, como mostrado na Figura 6.

**Figura 5:** Porcentagem de hemicelulose de alguns materiais lignocelulósicos.



**Figura 6:** Concentração de xilose no liquor após hidrólise ácida de alguns materiais lignocelulósicos.



Deve-se considerar ainda, que os teores de cada um dos componentes presente no bagaço de caju podem variar de acordo com o clima, região, condições do plantio de cajueiro, condições de colheita e também como o material é processado e armazenado (PINHO, 2009).

Devido à grande disponibilidade do bagaço de caju na Região Nordeste do Brasil, este trabalho contribui com a literatura em relação ao estudo da produção de xilose redutase utilizando o bagaço de caju como matéria-prima na produção da supracitada enzima.

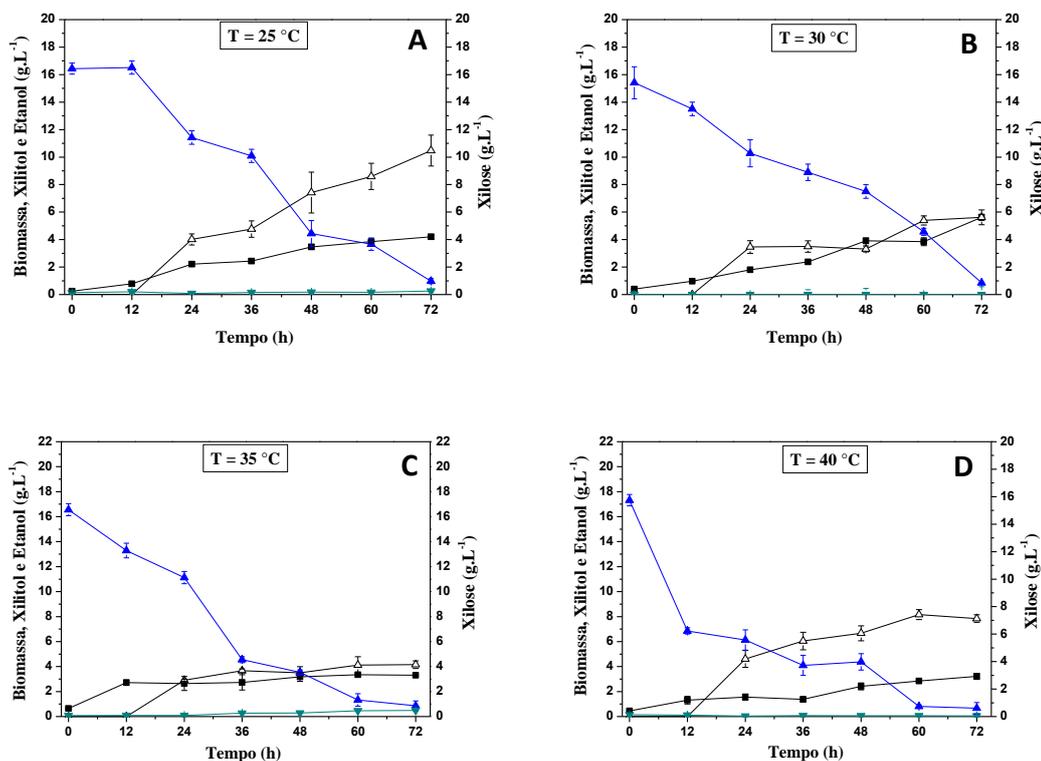
#### **4.2 Influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase e do xilitol utilizando meio formulado (MF)**

Inicialmente, avaliou-se a influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase (XR) e do xilitol pela levedura *C. tropicalis* ATCC750 utilizando o meio formulado (MF). O perfil do consumo de xilose, crescimento celular e produção de xilitol estão apresentados na Figura 7.

A levedura *Candida tropicalis* ATCC750 consumiu xilose em todas as temperaturas avaliadas, obtendo concentrações finais inferiores a 1 g.L<sup>-1</sup> com 72 h de bioprocessamento. O maior crescimento celular foi obtido na temperatura de 30 °C, com concentração celular próximo ao obtido no cultivo a 25 °C (5,62 g.L<sup>-1</sup>). O crescimento microbiano diminuiu com o aumento da temperatura obtendo 3,50 g.L<sup>-1</sup> e 3,05 g.L<sup>-1</sup> a 35 °C e 40 °C, respectivamente.

Comportamento similar de crescimento foi obtido no estudo realizado por Albuquerque *et al.*, 2014, que avaliou o crescimento celular de *C. tropicalis* em meio contendo xilose como fonte de carbono na concentração inicial de 40 g.L<sup>-1</sup> obtendo uma concentração de biomassa de 14,12 g.L<sup>-1</sup>. E o crescimento celular, com base na concentração inicial de xilose, foi maior comparado ao estudo realizado por Arruda *et al.* (2011), que avaliaram a produção das enzimas XR e XDH para produção de xilitol por *Candida guilliermondii* em meio composto por hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (com 75 g.L<sup>-1</sup> de xilose) e notaram uma produção máxima de biomassa celular de 10,6 g.L<sup>-1</sup> em 120 horas de fermentação a 30 °C.

**Figura 7:** Perfil do crescimento celular, concentração de xilose, etanol e xilitol no bioprocesso, para a produção da enzima xilose redutase por *Candida tropicalis* ATCC750, utilizando o meio formulado (MF) a diferentes temperaturas: (A) 25 °C, (B) 30 °C, (C) 35 °C e (D) 40 °C. Os dados experimentais são: (■) Concentração celular (g.L<sup>-1</sup>); (▲) Xilose (g.L<sup>-1</sup>); (▼) Etanol (g.L<sup>-1</sup>); e (Δ) Xilitol (g.L<sup>-1</sup>).



A levedura avaliada sintetizou a enzima xilose redutase e produziu xilitol, obtendo um extrato bruto com atividade de 0,365 U.mL<sup>-1</sup> e produziu 10 g.L<sup>-1</sup> de xilitol a 25 °C, correspondendo a um rendimento de 0,68 g<sub>XILITOL</sub>.g<sub>XILOSE</sub><sup>-1</sup> e produtividade de 0,15 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, conforme apresentado nas Tabelas 6 e 7. Porém, no bioprocesso conduzido a 40 °C a atividade obtida foi 0,480 U.mL<sup>-1</sup> e uma produção de xilitol de 9,26 g.L<sup>-1</sup>, correspondendo a um rendimento de 0,56 g<sub>xilitol</sub>.g<sub>xilose</sub><sup>-1</sup> e produtividade de 0,13 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Diante dos resultados obtidos, não foi possível observar uma correlação positiva entre o crescimento celular e a atividade enzimática para a temperatura de 30 °C. Em condições experimentais, o extrato bruto de XR apresentou atividade próxima ao obtido por outros estudos. Cortez *et al.* (2006), por exemplo, obtiveram uma atividade de 0,320 U.mL<sup>-1</sup> a 25 °C e 0,431 U.mL<sup>-1</sup> a 40 °C.

**Tabela 6:** Influência da temperatura no crescimento celular e produção de xilitol por *Candida tropicalis* ATCC750 utilizando o meio formulado (MF). Dados reportados com 72 h de processo e 150 rpm de acordo com cada temperatura.

Temperatura (°C)	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	Xilose remanescente (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P1/S1</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	P <sub>1máx</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Q <sub>P1</sub> (g.h <sup>-1</sup> .L <sup>-1</sup> )
25	4,20	0,97	0,68	10,47	0,15
30	5,62	0,85	0,39	5,62	0,08
35	3,31	0,87	0,26	4,15	0,06
40	3,05	0,67	0,56	9,26	0,13

**Tabela 7:** Influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase por *Candida tropicalis* ATCC750 usando meio formulado (MF). Dados reportados com 72 h de processo e 150 rpm de acordo com cada temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade Enzimática (U.mL <sup>EXTRATO</sup> <sup>-1</sup> )	Atividade Específica (U.g <sup>CÉLULAS</sup> <sup>-1</sup> )	Atividade Específica (U.mg <sup>PROTEÍNA</sup> <sup>-1</sup> )
25	0,365	0,730	0,076
30	0,297	0,590	0,076
35	ND	ND	ND
40	0,480	0,960	0,057

\*ND: Não foi possível determinar os valores da atividade nesta temperatura.

Como pode ser observado na Tabela 7, maiores valores de atividade enzimática por célula (0,730 U.g<sup>-1</sup>) e atividade específica (0,06 U.mg<sup>-1</sup>) foram obtidos a 25 °C usando o meio formulado para a produção da enzima XR, temperatura que propiciou o maior crescimento.

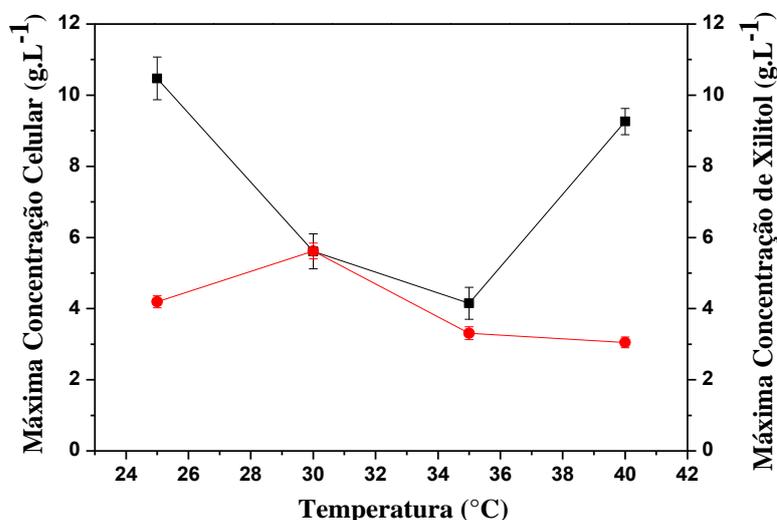
Não foi observada a produção de etanol, indicando que a levedura utilizou a via das Pentoses para a produção de xilitol (vide Figura 1), pois como no meio não foi acrescentado glicose que é o substrato preferencial da *Candida*, pode-se dizer que houve

uma indução do metabolismo na produção da enzima xilose redutase e do xilitol no meio formulado, em que a xilose foi o único substrato acrescentado ao meio.

Os resultados do presente estudo com o meio formulado indicaram que o micro-organismo avaliado *Candida tropicalis* ATCC750 pode ser promissor na produção de xilose redutase. Yablochkova, Bolotnikova e Mikhailova (2003) estudaram a atividade de XR e XDH em diferentes espécies de leveduras (incluindo os gêneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis* e *Pachysolen*) e observaram que a cepa *C. tropicalis* Y-456 teve a mais alta atividade específica de XR. 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.

A Figura 8 representa os comportamentos da máxima concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e da máxima concentração de xilitol ( $\text{g.L}^{-1}$ ) com as temperaturas estudadas (25 °C, 30 °C, 35 °C e 40°C). Pode ser observado no gráfico que na temperatura de 25 °C ocorreu a maior concentração de xilitol, onde o consumo de substrato (xilose) durante esse processo favoreceu essa maior produção de xilitol. No processo conduzido a 30 °C, temperatura que o crescimento celular foi maior do que a da temperatura anterior (25 °C) ocorreu uma menor concentração do xilitol, em que o substrato metabolizado favorecendo mais o crescimento celular e produção da enzima ao invés de se direcionar para a produção de xilitol.

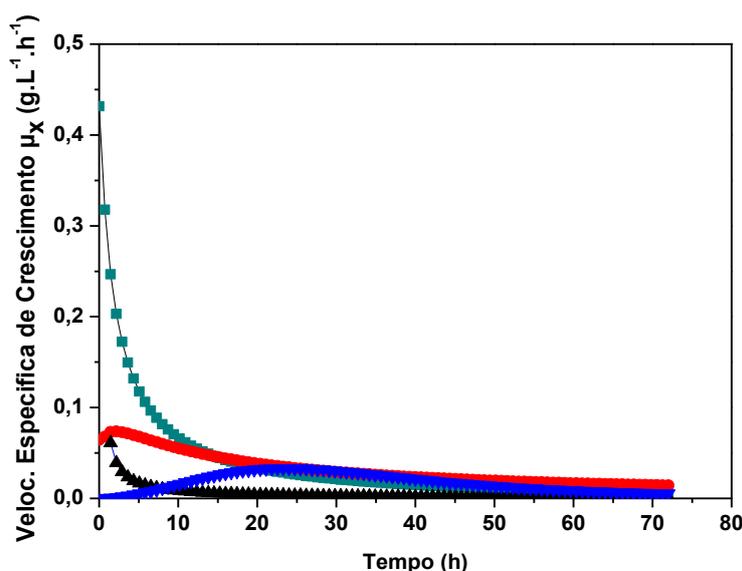
**Figura 8:** Influência da temperatura no crescimento celular e produção de xilitol por *Candida tropicalis* ATCC750 usando o meio formulado (MF). Dados experimentais: (■) Máxima concentração de xilitol ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (●) Máxima concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ).



A 35 °C ocorreu um menor crescimento celular em relação às temperaturas de 25 °C e 30 °C, considerando que esta temperatura (35 °C), segundo Rafiqul *et al.* (2015), não está dentro das condições que favorecem a produção do xilitol. Já na maior temperatura estudada, 40 °C, onde acontece o menor crescimento celular, há uma grande produção de xilitol, o que poderia ser justificado pela hipótese de que em condições altas de temperatura a produção de xilitol iria aumentar, uma vez que a maior parte da xilose se converterá ao xilitol com o crescimento celular limitado (KASTNER, 2001).

A influência da temperatura nas velocidades específicas de crescimento celular usando o meio formulado foi analisado e encontra-se apresentado na Figura 9, onde pode ser observado que quanto maior a temperatura, menor será a velocidade de crescimento específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ), o que está de acordo com o crescimento de biomassa onde obteve uma maior concentração nas menores temperaturas estudadas, sendo em 25 °C e 30 °C as velocidade de crescimento de 0,430 g. L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e 0,077 g. L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, e em 35 °C e 40 °C as velocidades diminuem para 0,062 g. L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e 0,037 g. L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Figura 9:** Influência da temperatura na velocidade específica de crescimento da levedura *Candida tropicalis* ATCC750 cultivada em meio formulado a diferentes temperaturas: (■) 25 °C, (●) 30 °C; (▲) 35 °C e (▼) 40 °C. Dados reportados com 72 h de processo e 150 rpm de acordo com cada temperatura.



### 4.3 Influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase e do xilitol utilizando hidrolisado do bagaço de caju (HBCD)

Após o estudo com meio formulado, avaliou-se a influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase (XR) e do xilitol pela levedura *Candida tropicalis* ATCC750 no meio hidrolisado hemicelulósico (HBCD), cujo perfil de crescimento celular, consumos de glicose, xilose e formação de produtos estão representados pela Figura 10.

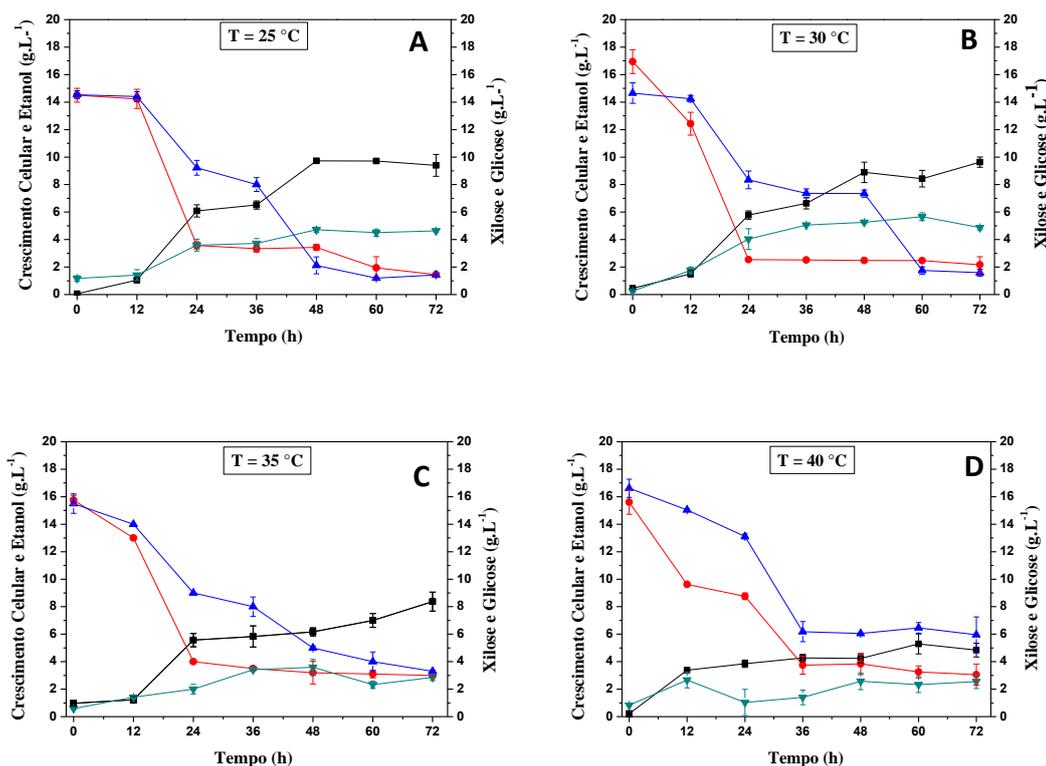
As temperaturas que favoreceram o maior crescimento celular foram 25 °C (9,39 g.L<sup>-1</sup>) e 30 °C (9,63 g.L<sup>-1</sup>) e com o aumento da temperatura houve uma diminuição do crescimento celular, adquirindo 4,84 g.L<sup>-1</sup> de biomassa a 40 °C, obtendo um perfil semelhante no meio formulado (MF). As concentrações de biomassa obtidas no meio HBCD foram superiores as concentrações obtidas no meio formulado, devido à maior concentração de carboidratos iniciais, pois continha glicose e xilose. Com isso, pode-se afirmar que o meio HBCD tornou-se mais propício para o crescimento da *C. tropicalis* em relação ao meio formulado.

Como no meio há glicose e xilose, e sob a maioria das condições a *Candida* prefere a glicose na mistura de xilose e glicose, a levedura consumiu preferencialmente glicose devido a repressão da enzima, na temperatura de 25 °C (KASTNER, 2001). Aproximadamente 70% da glicose foram consumidos com 24 h de processo. Nesse mesmo intervalo de tempo foi observado que apenas 40 % de xilose foram consumidos. Após 72 h, a levedura consumiu 90 % dos substratos xilose e glicose. O menor consumo de xilose foi verificado na temperatura de 40 °C, restando no meio 5,93 g.L<sup>-1</sup> de xilose.

No meio HBCD não foi observado a produção de xilitol, porém, houve a produção de etanol, em todas as temperaturas, já que a levedura consumiu preferencialmente a glicose, sendo este carboidrato utilizado na via glicolítica (vide Figura 1) para a produção de etanol, obtendo a maior concentração de etanol a 30 °C (5,66 g.L<sup>-1</sup>).

A presença de substâncias inibidoras como o ácido acético e o ácido fórmico, pode diminuir o metabolismo da xilose, por se tratar de substâncias tóxicas à enzima xilose redutase que catalisa a reação de síntese do xilitol a partir da xilose (ALBUQUERQUE, 2015; RAFIQUUL *et al.*, 2015).

**Figura 10:** Perfil do crescimento celular, concentração de carboidratos e etanol no bioprocesso utilizando o meio hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju (HBCD) por *Candida tropicalis* ATCC750 durante 72 h e 150 rpm em diferentes temperaturas: (A) 25 °C, (B) 30 °C, (C) 35 °C e (D) 40 °C. Os dados experimentais: (■) Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (▲) Xilose ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (●) Glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e (▼) Etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ).



Apesar do micro-organismo não sintetizar xilitol, foi observado a produção da enzima XR através da determinação da atividade enzimática do extrato bruto. Observa-se na Tabela 8, que a maior atividade foi obtida a 25 °C ( $0,265 \text{ U.mL}^{-1}$ ), correspondendo à atividade enzimática por célula de  $0,530 \text{ U.g}^{-1}$  e atividade específica de  $0,071 \text{ U.mg}^{-1}$ . Esta temperatura coincide com uma das temperaturas que favoreceram ao crescimento celular (25 °C e 30 °C).

**Tabela 8:** Influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase por *Candida tropicalis* ATCC750 usando o meio hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBCD). Dados reportados com 72 h de processo e 150 rpm de acordo com cada temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade Enzimática (U.mL <sup>EXTRATO</sup> <sup>-1</sup> )	Atividade Específica (U.g <sup>CÉLULAS</sup> <sup>-1</sup> )	Atividade Específica (U.mg <sup>PROTEÍNA</sup> <sup>-1</sup> )
25	0,265	0,530	0,071
30	0,181	0,362	0,041
35	0,111	0,222	0,036
40	0,033	0,066	0,06

Apesar das concentrações celulares serem semelhantes nas temperaturas de 25 °C e 30 °C houve uma diminuição da atividade em praticamente 30 %, 0,181 U.mL<sup>-1</sup> a 30 °C, em relação à atividade de 25 °C (0,265 U.mL<sup>-1</sup>), provavelmente devido a rota metabólica ter desviado para a produção de etanol, pois a 30 °C obteve-se a maior concentração de etanol (5,66 g.L<sup>-1</sup>). De maneira geral, a atividade enzimática de XR diminui conforme o aumento da temperatura (35 °C e 40 °C), no processo de produção utilizando o meio HBCD, correlacionando com o decréscimo do crescimento celular para estas temperaturas.

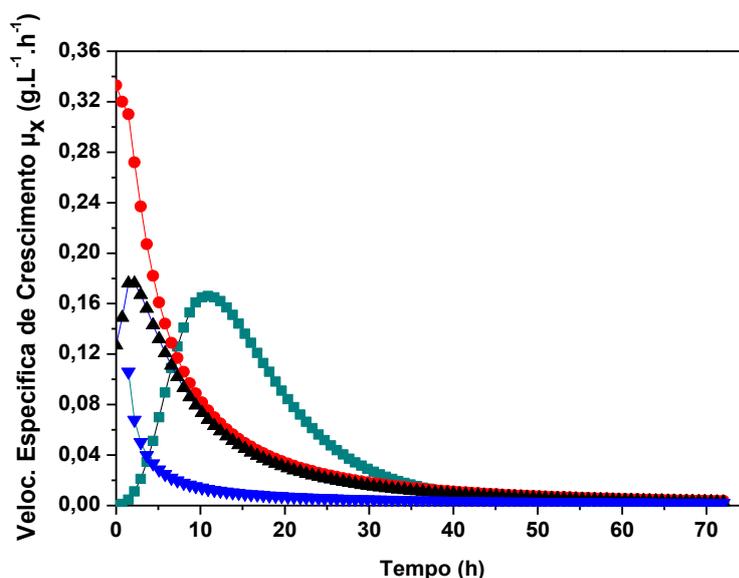
A atividade enzimática da XR obtida no meio HBCD foi menor do que a atividade de XR obtida no meio MF em todas as temperaturas avaliadas. No entanto, as atividades específicas nas temperaturas de produção de 25 °C, durante 72 h e 150 rpm foram semelhantes, indicando que o extrato enzimático obtido no cultivo de MF apresenta uma alta concentração de proteínas, além do custo da xilose PA adicionada ao meio MF.

A atividade específica de XR de *C. tropicalis* ATCC750 produzida a 25 °C é semelhante ou superior aos resultados obtidos por outros autores. Cortez *et al.* (2006) estudaram a produção de XR por *Candida guilliermondii* usando o hidrolisado

hemicelulósico de bagaço de cana e a atividade específica obtida foi  $0,38 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Kim *et al.* (2015) utilizaram a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 e a XR produzida em meio sintético apresentou uma atividade de  $0,37 \text{ U}/\text{mg}$ . Rafiqul e Sakinah (2014b) avaliaram em seu estudo o uso do hidrolisado de serragem de madeira Meranti na produção de XR por *C. tropicalis*, e a maior atividade específica encontrada foi  $0,91 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

A influência da temperatura na cinética do bioprocesso usando o meio hidrolisado do bagaço de caju (HBCD) por *Candida tropicalis* ATCC750 está apresentada na Figura 11. A taxa de crescimento específico máximo foi obtido a  $30^\circ\text{C}$ , com o maior crescimento celular, e é menor a  $40^\circ\text{C}$ , onde ocorreu o menor crescimento celular. A velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) é aproximadamente constante após 30 h de processo. Os resultados de  $Y_{X/S}$  diminuem conforme a temperatura aumenta, no qual a  $25^\circ\text{C}$  e  $30^\circ\text{C}$  possuem rendimentos de  $0,357 \text{ (g}_{\text{biomassa}}\cdot\text{g}_{\text{xilose+glicose}})$  e  $0,329 \text{ (g}_{\text{biomassa}}\cdot\text{g}_{\text{xilose+glicose}})$ , respectivamente, diminuindo a  $35^\circ\text{C}$  e  $40^\circ\text{C}$ , com rendimentos de  $0,296 \text{ (g}_{\text{biomassa}}\cdot\text{g}_{\text{xilose+glicose}})$  e  $0,200 \text{ (g}_{\text{biomassa}}\cdot\text{g}_{\text{xilose+glicose}})$ , respectivamente, coincidindo com o maior crescimento celular nas temperaturas de  $25^\circ\text{C}$  e  $30^\circ\text{C}$ , e assim com o maior consumo de substrato.

**Figura 11:** Influência da temperatura na velocidade específica de crescimento usando o meio hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju por *Candida tropicalis* ATCC750. Dados reportados com 72 h de processo e 150 rpm de acordo com cada temperatura. Os dados experimentais são: (■)  $25^\circ\text{C}$ , (●)  $30^\circ\text{C}$ ; (▲)  $35^\circ\text{C}$  e (▼)  $40^\circ\text{C}$ .



Estes resultados e comparações indicam que a levedura avaliada e o meio hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju podem ser utilizados na produção da enzima xilose redutase. No entanto, com o objetivo de aumentar a produção da enzima e produzir xilitol, avaliou-se a suplementação do meio hidrolisado com xilose, para avaliar se maiores concentrações de xilose desvia a rota metabólica glicosídica.

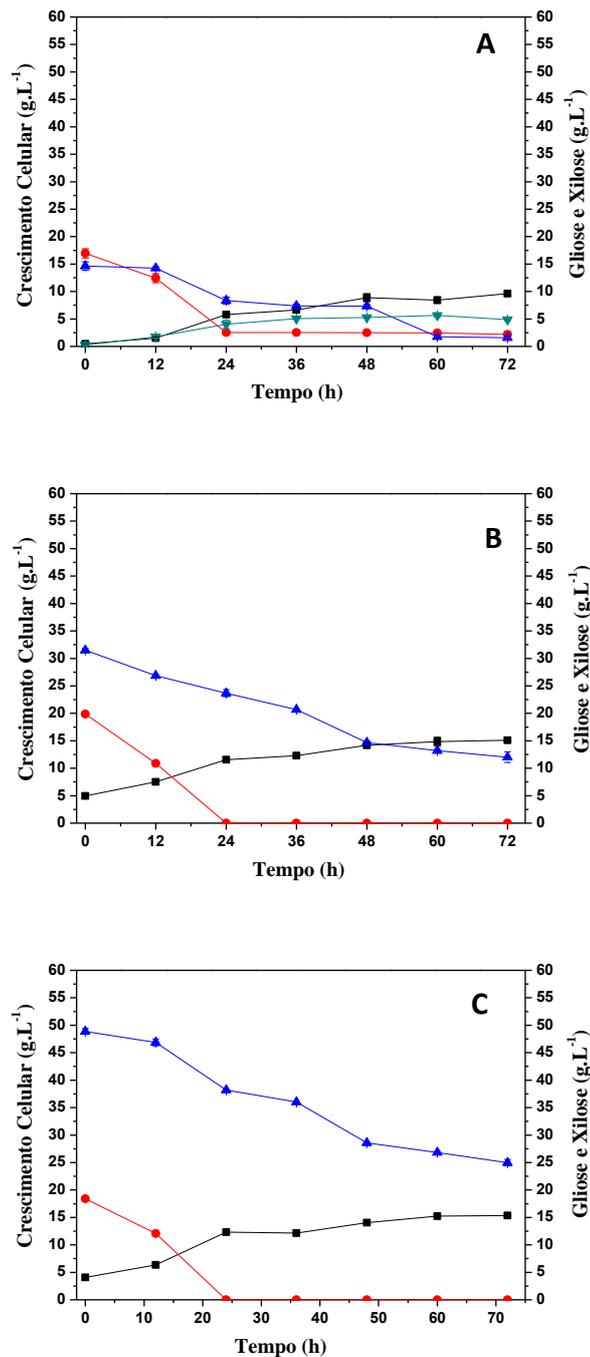
#### 4.4 Influência da concentração inicial de xilose

Avaliou-se a capacidade da *Candida tropicalis* ATCC750 produzir xilitol e a enzima XR no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju sob diferentes concentrações iniciais de xilose. Os resultados para este estudo estão apresentados na Figura 12 no gráfico (A) concentração inicial de xilose de 20 g.L<sup>-1</sup>, em (B) 40 g.L<sup>-1</sup>, e em (C) com 60 g.L<sup>-1</sup>, a partir do HBCD, com uma síntese dos resultados apresentada na Tabela 9.

Este acréscimo de diferentes concentrações de xilose em meio de hidrolisado hemicelulósico a 30 °C e 150 rpm não favoreceram a produção de xilitol. Contudo, segundo o estudo realizado por Kastner (2001) mostra que sendo a concentração da xilose muitas vezes maior que a concentração da glicose, será possível a produção de xilitol seguindo então a via das pentoses.

Em relação ao crescimento em biomassa, observa-se que em B (40 g.L<sup>-1</sup> xilose) houve um crescimento celular de 15,08 g.L<sup>-1</sup>, pouco menor que em C (60 g.L<sup>-1</sup> xilose) que foi de 15,33 g.L<sup>-1</sup>, e maior que em A (20 g.L<sup>-1</sup> xilose) com concentração celular (9,63 g.L<sup>-1</sup>). Com estes resultados observa-se que altas concentrações de xilose no meio inibiram o crescimento celular, já que há uma preferência pela rota glicosídica por parte do micro-organismo, onde o consumo da glicose em todas as concentrações avaliadas foi de 100 % em apenas 24 h de fermentação. Já a xilose foi sendo consumida mais lentamente durante as 72 h de fermentação nesses dois meios (A e B). Em (B), foi consumido 60 % da xilose e em (C) 48% após as 72 h de fermentação. Não foi detectada a produção de etanol nos meios de cultivo com maior concentração de xilose, mas apenas em (A), onde há o consumo simultâneo de xilose e glicose.

**Figura 12:** Dados experimentais do processo de fermentação utilizando o meio hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju por *Candida tropicalis* ATCC750 a 30 °C e 150 rpm, através de três procedimentos: (A) meio hidrolisado (HBCD), (B) meio hidrolisado suplementado com 20 g.L<sup>-1</sup> de xilose e (C) meio hidrolisado acrescentado de 40 g.L<sup>-1</sup> de xilose Os dados experimentais são os seguintes: (■) Concentração celular (g.L<sup>-1</sup>); (▲) Xilose (g.L<sup>-1</sup>); (●) Glicose (g.L<sup>-1</sup>) e (▼) Etanol (g.L<sup>-1</sup>).



**Tabela 9:** Estudo da concentração inicial de xilose no meio hidrolisado do bagaço de caju.

Concentração Inicial de Xilose (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	Xilose Final (g.L <sup>-1</sup> )	Etanol (P <sub>2máx</sub> ) (g.L <sup>-1</sup> )
20	9,63	1,39	4,86
40	15,08	12,02	-
60	15,33	24,97	-

\* P<sub>2máx</sub>: máxima concentração de etanol.

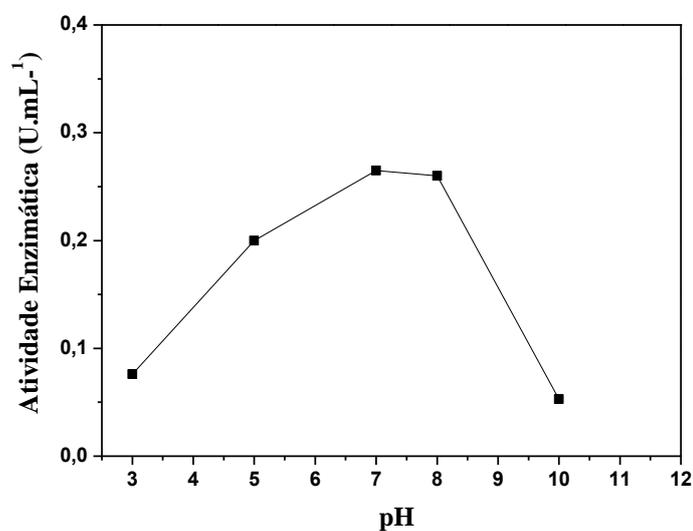
## 4.5 Caracterização parcial da enzima xilose redutase (XR)

### 4.5.1 Estudo do pH ótimo e temperatura ótima

A xilose redutase produzida usando o meio HBCD a 25 °C foi caracterizada determinando-se o pH ótimo, a temperatura ótima e a sua massa molecular.

O pH ótimo de atividade da enzima xilose redutase foi obtido pela determinação da atividade em diferentes pHs fixando a temperatura em 25 °C e os resultados estão ilustrados na Figura 13.

**Figura 13:** Influência do pH na atividade enzimática da enzima xilose redutase de *Candida tropicalis* ATCC750 a 25 °C, produzida utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju (HBCD) como substrato.

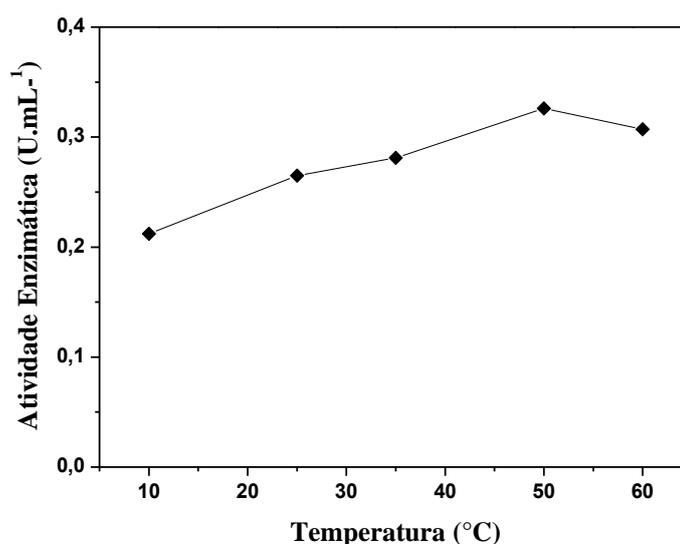


A enzima XR de *C. tropicalis* ATCC750 exibiu uma atividade ótima, utilizando xilose como substrato, nos pHs 7 e 8,0, comportamento semelhante com XR obtidas por *Candida tropicalis* (RAFIQUL *et al.*, 2015), *Candida parapsilosis* (LEE *et al.*, 2003) e *C. intermedia* (NIDETZKY *et al.*, 2003).

A diminuição da atividade é possivelmente devido à ionização dos grupos envolvidos que limitam a ligação da enzima ao seu(s) substrato(s) ou na formação do complexo enzima- coenzima que viabiliza a catálise (Rafiqul *et al.*, 2015a). Além disso, um pH extremo pode causar desnaturação parcial ou inativação da enzima por alterar sua conformação nativa (RAFIQUL *et al.*, 2015).

Os resultados da atividade enzimática de XR a várias temperaturas estão representados na Figura 14. Observou-se que a temperatura ótima para XR foi de 50 °C (com atividade de 0,326 U.mL<sup>-1</sup>), utilizando xilose como substrato. Na temperatura maior (60 °C) ocorreu uma diminuição da atividade enzimática, provavelmente já iniciando o processo de inativação da enzima. Este resultado obtido está próximo da faixa de temperatura ótima obtido por XR de *Pichia stipitis*, com uma temperatura ótima superior a 38 °C (VERDUYN *et al.*, 1985), XR de *Neurospora crossa*, com temperatura na faixa de 45 °C a 55 °C (WOODYER *et al.*, 2004).

**Figura 14:** Influência da temperatura na atividade enzimática da enzima xilose redutase de *Candida tropicalis* ATCC750 a pH 7,0, produzida a 25 °C utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju (HBCD) como substrato.

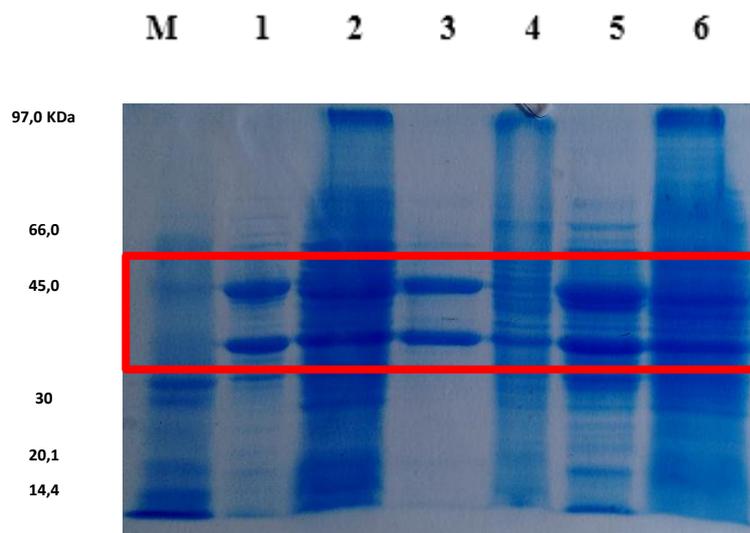


Vários estudos obtiveram a temperatura ótima de XR de *Candida intermedia* (NIDETZKY *et al.*, 2003), *C. guilliermondii* (CORTEZ *et al.*, 2006) e *Candida tropicalis* (RAFIQUL e SAKINAH, 2014 b) a 25 °C, e nesta temperatura a atividade da XR obtida neste estudo foi de 0,280 U.mL<sup>-1</sup>, com uma diferença de 15% comparada a atividade obtida na temperatura de 50 °C.

#### 4.5.2 Eletroforese e identificação de proteínas da xilose redutase

A Figura 15 representa a eletroforese do extrato de enzima xilose redutase (XR) produzido. Na primeira faixa (M), têm-se os marcadores de massa molar. Da segunda a sexta faixa, encontram-se as amostras da enzima XR produzida por *Candida tropicalis* ATCC750. As faixas denominadas 1 e 2 representam a XR obtida utilizando os meios HBCD (hidrolisado com pH ajustado e tratado com carvão ativado) e meio formulado (MF) a 25 °C, respectivamente, as faixas denominadas 3 e 4 representam a XR obtida utilizando os meios HBCD e meio MF a 30 °C, respectivamente, e as faixas denominadas 5 e 6 os meios HBCD e meio MF a 40 °C, respectivamente.

**Figura 15:** Eletroforese em SDS-PAGE do extrato enzimático de XR de *Candida tropicalis* ATCC750 produzida em diferentes meios e a diferentes temperaturas.



**Fonte:** Autoria própria

\* M: marcador de massa molar. 1, 3, 5 - - xilose obtida usando o meio HBCD a 25 °C, 30 °C e 40 °C, respectivamente. 2, 4, 6 - xilose obtida usando o meio formulado (MF) a 25 °C, 30 °C e 40 °C, respectivamente.

De acordo com o eletrograma (Figura 15), pode ser identificado a massa molecular na faixa de aproximadamente 30 kDa para a XR produzida em todas as condições, sendo este resultado corroborado pela faixa de massa molecular da enzima xilose redutase encontrado na literatura.

A massa molecular da xilose redutase pode variar muito dependendo do micro-organismo de origem, sendo que pode alcançar valores de 30 a 70 KDa. Segundo Cortez *et al.* (2006), a XR de *Candida guilliermondii* FTI 20037 é composta por uma ou duas unidades de 30-60 KDa. Handumhongkul e Silva (1998) purificaram a enzima XR de *C. guilliermondii* e obtiveram uma massa molecular de 36 KDa. Ho *et al* (1990) relataram em seus estudos uma XR de *C. shehatae* com 33 KDa. Ditzelmuller *et al.* (1984) purificou uma XR de *Pachysolen tannophilus* e obtiveram uma massa molecular de 30-40 KDa. Dessa forma, a XR produzida por *Candida tropicalis* ATCC750 apresentou massa molecular semelhante às citadas na literatura.

Também é observado duas faixas intensas nas análises, indicando que a xilose redutase de *C. tropicalis* ATCC750 é heterodimérica, por possuírem cadeias diferentes entre si, em que uma estrutura se liga ao NADPH e a outra estrutura ao substrato xilose. Estudos recentes comprovaram que são possíveis diversos tipos de xilose redutase quanto à estrutura, podendo ser monoméricas ou diméricas (homodiméricas ou heterodiméricas) (WILSON *et al.*, 2002) dependendo do micro-organismo.

Os extratos enzimáticos obtidos no cultivo com HBCD (localizados nas faixas 1, 3 e 5) apresentam-se mais nítidos comparados aos extratos obtidos pelo cultivo em MF (localizados nas faixas 2, 4 e 6), provavelmente devido à concentração de proteínas (vide Figura 15).

De modo geral, a enzima XR de *C. tropicalis* ATCC750 exibiu uma atividade ótima nos pHs 7 e 8,0, e a sua temperatura ótima foi de 50 °C (com atividade de 0,326 U.mL<sup>-1</sup>), utilizando xilose como substrato. De acordo com o eletrograma (Figura 15), foi possível ser identificado a massa molecular na faixa de aproximadamente 30 kDa para a XR produzida em todas as condições, além de indicar que a XR é heterodimérica, pois foram identificados duas faixas intensas nas análises, em que uma estrutura se liga ao NADPH e a outra estrutura ao substrato xilose.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram o potencial da levedura *Candida tropicalis* ATCC750 e do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju para a produção da enzima xilose redutase, obtendo atividade máxima ( $0,265 \text{ U.mL}^{-1}$ ) no meio hidrolisado hemicelulósico (HBCD) a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Com esse estudo, foi possível concluir de forma geral que a temperatura influencia diretamente na produção de xilose redutase e de xilitol, e que a presença da glicose pode desviar a rota de produção da enzima xilose redutase e do xilitol. A produção de xilitol não ocorreu no meio hidrolisado hemicelulósico, mesmo após a adição de xilose no meio, sendo produzido apenas no meio formulado, o qual não continha glicose em sua composição, devendo ser estudada mais extensivamente em pesquisas posteriores.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, Tiago Lima de. **Produção biotecnológica de xylitol a partir de hidrolizadp de bagaço de caju**. 2015. 148 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-ce, 2015.

ALBUQUERQUE, Tiago Lima de *et al.* Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA 510. **Catalysis today**. Fortaleza-Ce, p. 33-40. 23 dez. 2014.

ARRUDA, Pv de *et al.* Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**. EUA, p. 815-22. jul. 2011.

BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy conversion and management**. Trebizonda (Turquia), p. 858-875. 15 ago. 2010.

LAVILE, M. *et al.* Insulin, glucagon and catecholamine responses to the ingestion of various carbohydrates. In: BAR, A. *et al.* **Dietary starches and sugars in man: a comparison**. Oxford Road: Series Editor, 1992. p. 213-219.

BARROS, E.M. *et al.* A yeast isolated from cashew apple juice and its ability to produce first-and second-generation ethanol. **Applied biochemistry and biotechnology**. EUA, p. 2762-2776. 20 set. 2014.

BOUSSARSAR, Houda; ROGÉ, Barbara; MATHLOUTHI, Mohamed. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. **Bioresource technology**. Centre Europol'agro (France), p. 6537-6542. 06 ago. 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**. Athens (Geórgia), p. 248-254. 29 jan. 1976.

BRANCO, Ricardo de Freitas; SANTOS, Julio C. dos; SILVA, Silvio S. da. A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: xylitol enzymatic production. **Biomass and bioenergy**. São Paulo (Brasil), p. 3241-3246. 05 abr. 2011.

BRIONES, Rodrigo; SERRANO, Luis; LABIDI, Jalel. Valorization of some lignocellulosic agro-industrial residues to obtain biopolyols. **Journal of chemical technology biotechnology**. EUA, p. 244-249. 10 abr. 2011.

CHENG, Ke-ke *et al.* Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. **Biochemical engineering journal**. Beijing (china), p. 203-207. 15 fev. 2009.

CORREIA, Jessyca Aline da Costa *et al.* Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. **Process biochemistry**. Fortaleza-Ce (Brasil), p. 249-256. jul. 2013.

CORREIA, Jessyca Aline da Costa *et al.* Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource technology: bioresource technology**. Fortaleza-ce (Brasil), p. 249-259. mar. 2015.

CORTEZ, Ely Vieira *et al.* Characterization of xylose reductase extracted by CTAB-reversed micelles from *Candida guilliermondii* homogenate. **Brazilian journal of pharmaceutical sciences**. São Paulo (Brasil), p. 251-257. abr. 2006.

DITZELMÜLLER, Günther *et al.* Xylose Metabolism in *Pachysolen tannophilus*: purification and properties of xylose reductase, Can. **Canadian journal of microbiology**. Canadá, p. 1330-1336. abr. 1984.

DURAIRAJ, L. *et al.* Safety assessment of inhaled xylitol in subjects with cystic fibrosis. **Occupational medicine**. EUA, p. 31-34. 06 jan. 2007.

FREITAS, Maria de Fátima Matos de. **Imobilização da enzima b-Galactosidase produzida por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em soro de leite**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Centro Tecnológico, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, 2013.

GOUVEIA, Ester Ribeiro; NASCIMENTO, Renata Trajano do; SOUTO-MAIOR, Ana Maria. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química nova**. São Paulo (Brasil), p. 1500-1503. 25 fev. 2009.

GRANSTRÖM, T. B.; IZUMORI, K.; LEISOLA, M.. A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. **Applied microbiology and biotechnology**. EUA, p. 277-281. fev. 2007.

HAMES, B. *et al.* Preparation of samples for compositional analysis laboratory analytical procedure (LAP). **Technical report Nrel/tp-510-42620**, Columbus, Ohio (EUA), p. 01-12, 28 set. 2005.

HANDURMOUGKUL, C.; SILVA, D. P. M.. Cloning and expression of *Candida guilliermondii* xylose reductase gene (xyll) in *pichia pastoris*. **Appl microbiol biotechnol**. Mississippi (USA), p. 399-404. 21 nov. 1997.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Celi wall structural foundations: molecular basics for improving forage digestibilities. **Crop sci.**, p. 27-37, jan. 1999.

HO, N.W.Y. Purification, characterization and amino terminal sequence of xylose reductase from *Candida shehatae*. **Enzyme microb. technol.** West Lafayette, p. 33-39. jan. 1990.

HUANG, Chiung-fang *et al.* 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.** Taiwan, p. 3322-3329. fev. 2011.

M. S., Islam. Effects of xylitol as a sugar substitute on diabetes-related parameters in nondiabetic rats. **Journal of medicinal food**, EUA, p. 505-511, mar. 2011.

TW, Jeffries. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current opinion in biotechnology**, EUA, p. 320-326, maio 2006.

JEFFRIES, T. W.; ALEXANDER, M. A. Production of ethanol from xylose by *Candida shehatae* grown under continuous or fedbatch conditions. **Biotechnology in pulp and paper manufacture**, Boston, p. 311-321, jan. 1990.

KASTNER, James R.; EITEMAN, Mark A.; LEE, Sarah A. Glucose repression of xylitol production in *Candida tropicalis* mixed-sugar fermentations. **Biotechnology letters**, EUA, p. 1663-1667, out. 2001.

KAVANAGH, L. K. *et al.* Alternating dimer contacts in xylose reductase from *Candida tenuis* by site-direct mutagenesis: structural and functional properties of R180 A mutant. **Chemico-biological interactions**, p. 523-532, 2002.

KESHWANI, Deepak Radhakrishin. Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production. **University microfilms international (UMI)**, Raleigh (Carolina do Norte), p. 644-52, maio 2009.

JS, Kim *et al.* Enhanced xylitol production by mutant *Kluyveromyces marxianus* 36907 – FMEL1 due to improved xylose reductase activity. **Appl biochem biotechnol**, EUA, p. 1975-1984, jun. 2015.

LATIF, Farooq; RAJOKA, Mohammad Ibrahim. Production of ethanol and xylitol from corn by yeasts. **Bioresource technology.** Faisalabad (Pakistan), p. 57-63. mar. 2001.

LEE, Jung-kul; KOO, Bong-seong; KIM, Sang-yong. Cloning and characterization of the xylI gene, encoding an NADH-Preferring xulose reductase from *Candida parapsilosis*, and its functional expression in *Candida tropicalis*. **Applied and Environmental microbiology**, EUA, p. 6179-6188, out. 2003.

SH, Lee; B. K., Choi; YJ, Kim. The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. **archives Of Oral Biology**, EUA, p. 697-703, jan. 2012.

LIMA, Luanne Helena Augusto. **Estudo molecular dos genes XYL1 e XYL2 de *Candida tropicalis* visando a produção de xilitol**. 2006. 177 f. Tese (Doutorado) - Curso de biologia molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

MAIA, Maria Cristina Antun *et al.* Consumer evaluation of ice cream with xylitol. **Food Science and technology**. Campinas, p. 341-347. abr. 2008.

MATTILA, P. T. *et al.* The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. **Metabolism: clinical and experimental**, EUA, p. 548-51, abr. 2005.

MATEO, Soledad *et al.* Detoxification of hemicellulosic hydrolysate from olive tree pruning residue. **Industrial crops and products**. São Paulo (Brasil), p. 196-203. out. 2013.

MICHEL, Ângela Cristina Schirmer. **Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casca de soja**. 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MISRA, Swati; RAGHUWANSHI, Shailendra; SAXENA, R. k. Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. **Carbohydrate polymers**. New Delhi (India), p. 1596-1601. 15 fev. 2013.

MOURO, Adriane. **Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MUSSATTO, Solange Inês; ROBERTO, Inês Conceição. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Brazilian journal of pharmaceutical Science**, São Paulo (Brasil), p. 401-13, out. 2002.

NIDETZKY, B. *et al.* Multiple forms of xylose reductase in *Candida intermedia*: comparison of their functional properties using quantitative structure–activity relationships, steady-state kinetic analysis, and pH studies. **J. agric. food chem.** EUA, p. 7930-5, 31 dez. 2003.

NIDETZKY, B. *et al.* Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor. **Biotechnol. bioeng.** EUA, p. 387-396. 05 nov. 1996.

PARAJÓ, Juan Carlos; DOMÍNGUEZ, Herminia; DOMÍNGUEZ, Josémanuel. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource technology.** Ourense (Spain), p. 25-40. out. 1998.

PAUL, S. *et al.* Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource technology**, EUA, p. 449-55, nov. 2013.

PÉREZ, J. *et al.* Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International microbiology.** Eua, p. 53-63. jun. 2002.

PINHO, Lívia Xerez. **Aproveitamento do resíduo do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) para alimentação humana.** 2009. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Ciência e Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-ce, 2009.

PORTUGAL, Apolinário Vaz. Sistemas de produção de alimentos de origem animal no futuro. **Revista portuguesa ciências veterinárias**, Lisboa, p. 63-70, jan. 2002.

RAFIQULA, I. S. M.; SAKINAH, A. M. M.; ZULARISAM, A. W. Evaluation of sawdust hemicellulosic hydrolysate for bioproduction of xylitol by enzyme xylose reductase. **Food and bioproducts processing.** Pahang (Malaysia), p. 82-89. abr. 2015.

I. S., Rafiqul; A. M., Sakinah; A. W. Zularisam. Inhibition by toxic compounds in the hemicellulosic hydrolysates on the activity of xylose reductase from *Candida tropicalis*. **Biotechnol lett.** Kuantan (Malásia), p. 191-6. jan. 2015.

RAFIQUL, I. S. M.; SAKINAH, A. M. Mimi. Design of process parameters for the production of xylose from wood sawdust. **Chemical engineering research and Design.** Kuantan (Malásia), p. 13071-1312. set. 2012.

RAFIQUL, I. S. M.; SAKINAH, A. M. M. Biochemical properties of xylose reductase prepared from adapted strains of *Candida tropicalis*. **Applied biochemistry and biotechnology.** Kuantan (Malásia), p. 387-399. 10 out. 2014 b.

READING, N. Scott; WELCH, Kevin D.; AUST, Steven D. Free radical reactions of wood-degrading fungi. **In: wood deterioration and preservation: advances in our changing world, washing: acs symposium series.** Logan (EUA), p. 16-31. 31 mar. 2003.

ROCHA, Maria Valderez Ponte *et al.* Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. **Journal of industrial microbiology & biotechnology.** Fortaleza-ce (Brasil), p. 1099-107. ago. 2011.

ROCHA, Maria Valderez Ponte *et al.* Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology.** Fortaleza-ce (Brasil), p. 1099-107. ago. 2011.

ROCHA, Maria Valderez Ponte *et al.* Enzymatic Hydrolysis and fermentation pretreated cashew apple bagasse with alkali and diluted acid for bioethanol production. **Applied biochemistry and biotechnology.** Fortaleza-Ce (Brasil), p. 104-114. maio 2009.

ROCHA, Maria Valderez Ponte *et al.* Evaluation of diluted acid pretreatment on cashew apple bagasse for etanol and xylitol production. **Chemical engineering Journal.** Fortaleza-ce (Brasil), p. 234-243. maio 2014.

ROCHA, G. J. M. *et al.* A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. **Scienceopen.com,** Brasília, p. 03-08, jan. 1997.

RODRIGUES, Tigressa Helena Soares; PINTO, Gustavo; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. Effects of inoculum concentration, temperature, and carbon sources on tannase production during solid state fermentation of cashew apple bagasse. **Biotechnology and Bioprocess Engineering.** Fortaleza-ce (Brasil), p. 571-576. out. 2008.

RODRIGUES, Tigressa Helena Soares *et al.* Ethanol Production from cashew apple bagasse: improvement of enzymatic hydrolysis by microwave-assisted alkali pretreatment. **Applied biochemistry and biotechnology.** Fortaleza-Ce (Brasil), p. 929-943. jul. 2011.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal industry microbiology biotechnology.** EUA, p. 279-91. maio 2003.

SAHA, Badal C.; COTTA, Michael A. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. **Enzyme microb. technol.** Peoria (USA), p. 528-532. set. 2007.

SLUITER, A. *et al.* Determination of extractives in Biomass. *Technical report* NREL/TP-510-42619 **National renewable energy laboratory**, EUA, p. 01-12, jan. 2008a.

SLUITER, A. *et al.* Determination of total solids in biomass and total dissolved Solids in liquid process samples laboratory. *Technical report* NREL/TP-510-42621. **National Renewable energy laboratory**, EUA, p. 01-09, 31 mar. 2008b.

SLUITER, A. *et al.* Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Technical report* NREL/TP-510-42618. **National renewable energy laboratory**, EUA, p. 01-18, abr. 2008c.

MAIA, Geraldo Arraes *et al.* Caracterização química de pedúnculos de diferentes clones de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale*, L.). **Revista ciência agrônômica**, Fortaleza-Ce (Brasil), p. 272-278, out. 2004.

KESHWANI, Deepak Radhakrishin. **Sobiologia**. 2012. Disponível em: <<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia/cito4.php>>. Acesso em: 04 mar. 2016.

STAMBUK, Boris U. *et al.* Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of science of industrial research**. Nova Deli (Índia), p. 918-926. nov. 2008.

VERDUYN, C. *et al.* Properties of the NAD(P)H- dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Biochemical journal**. EUA, p. 669-677. 15 mar. 1985

YZ, Zou *et al.* 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**. EUA, p. 149-52. fev. 2010.

YM, Wang; JH, Patterson; J., van Eys. The potential use of xylitol in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency anemia. **The journal of clinical investigation**. Carolina do Norte, EUA, p. 1421-8. jul. 1971.

WERPY, T. *et al.* **Top value added chemicals from biomass**. Washington, Estados Unidos: U.S. Department of energy (doe) by the national renewable energy laboratory a doe national laboratory, 2004. 76 p.

WILSONA, David K *et al.* The xylose reductase (AKR2B5) structure: homology and divergence from other aldo-keto reductase and opportunities for protein engineering. **Chemico-biological interactions**. Áustria, p. 515-521. fev. 2003.

WINKELHAUSEN, Eleonora *et al.* Sensory and microbiological quality of a baked product containing xylitol as an alternative sweetener. **International journal of food properties**. Macedônia, p. 639-649. 10 ago. 2007.

WOODYER, Ryan *et al.* Heterologous expression, purification and characterization of a highly active xylose reductase from *Neurospora crassa*. **Applied biochemistry and microbiology**. EUA, p. 1642-1647. mar. 2005.

EN, Yablochkova *et al.* Specific features of fermentation of D-xylose and D-glucose by xylose-assimilating yeasts. **Applied biochemistry and microbiology**. Rússia, p. 265-269. maio 2013.

YOKOYAMA, Shin-ichiro *et al.* Purification, characterization and structure analysis of NADPH dependent D-xylose reductases from *Candida tropicalis*. **Journal of fermentation and bioengineering**. Japão, p. 217-223. out. 1995.