UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

LUCIANA CRISTINA SILVEIRA CHAUD

**Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do
hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção
biotecnológica de xilitol**

**Lorena – SP
2010**

LUCIANA CRISTINA SILVEIRA CHAUD

Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena (EEL) da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Concentração: Conversão de Biomassa.

Orientador: Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe

**Lorena – SP
2010**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catlogação na Publicação

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Chaud, Luciana Cristina Silveira

Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol / Luciana Cristina Silveira Chaud ; orientadora Maria das Graças de Almeida Felipe. – Lorena: 2010.

97 pág. : fig.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 2. Polímero vegetal 3. Carvão ativado 4. Xilitol. I. Título

664.113 - CDU

*Ao meu marido, Maurício, aos meus
filhos Felipe e Mariana, pela
paciência, pela cooperação diária e
pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela perfeita harmonia, que inspira calma e paciência.

Aos meus familiares e amigos queridos, que sempre acreditaram que seria possível.

À Profa. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe, por sua calorosa amizade e sua orientação precisa e generosa, fazendo-me compreender que “não há atalho que leve ao completo domínio da ciência e só um árduo trabalho nos permite chegar à terra prometida do conhecimento” (Wu, 1960).

À querida amiga/irmã Priscila Vaz, que esteve presente em todos os momentos desta caminhada, pela amizade sincera, pelo incentivo oportuno e pelo auxílio despretensioso.

Aos queridos amigos Joseana e Márcio, que me receberam em suas vidas de forma tão carinhosa e prestativa.

Ao amigo Bruno, pelo auxílio, boa vontade e paciência.

Ao carinho das amigas Lili e Débora, que fizeram com que tudo parecesse mais fácil na reta final.

À Profa. Dra. Rita de Cássia, pelo carinho, pelos sábios conselhos e pela assistência na análise enzimática.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ), pela colaboração e convivência agradável.

A todos os amigos do DEBIQ, por partilharem seus conhecimentos e materiais e pelo convívio descontraído e alegre nos laboratórios.

Ao DEBIQ e à Escola de Engenharia de Lorena (EEL), pela infraestrutura.

A CAPES pelo auxílio financeiro, que possibilitou a conclusão deste trabalho.

BIOGRAFIA

Luciana Cristina Silveira Chaud

Data de nascimento: 18/03/1966

Dezembro 1987: Graduação em Farmácia e Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP- Ribeirão Preto-SP.

Dezembro 1994: Pós-graduação em Administração Hospitalar (Especialização) - Faculdade São Camilo- Sorocaba- SP.

Janeiro/ 1988 a Julho/1992: Atuação em farmácias de manipulação e drogarias - Sorocaba, SP.

Novembro/1989 a Fevereiro/2007: Atuação em Farmácia Hospitalar – Sorocaba, SP e Taubaté, SP.

Agosto/1998 a Janeiro/2001: Atuação como docente em Farmacologia e Cálculo de medicamentos – Sorocaba, SP.

Maio a Dezembro/2007: Aluno especial do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial da Escola de Engenharia de Lorena –USP – Lorena, SP.

Janeiro/2008: Ingressou no Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial, nível Mestrado, na Escola de Engenharia de Lorena – Lorena, SP.

RESUMO

CHAUD, L.C.S. **Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol.** 2010. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2010.

A crescente demanda pelo etanol combustível para reduzir a dependência e promover a substituição de combustíveis fósseis, contribuirá para maior acúmulo de bagaço de cana no ambiente. Esta biomassa que é no Brasil um subproduto do setor sucroalcooleiro, embora venha sendo empregada para a geração de energia na produção de açúcar e álcool, pode ter seu aproveitamento alternativo para a obtenção de especialidades como o xilitol contribuindo para trazer vantagens econômicas para este setor. Neste sentido, pesquisas vêm sendo feitas para o aproveitamento biotecnológico do bagaço de cana para a produção de xilitol, um poliol com características peculiares como seu poder adoçante semelhante ao da sacarose, não cariogênico e indicado para diabéticos e obesos bem como no tratamento de doenças respiratórias e na prevenção de osteoporose. Sua produção comercial ocorre por catálise química da xilose proveniente de materiais lignocelulósicos ricos em xilana o que é de custo elevado. Para a obtenção biotecnológica de xilitol a partir destes materiais, inicialmente é necessária a desconstrução da matriz polimérica destes para a separação de suas principais frações: celulose, hemicelulose e lignina. No caso do xilitol, a fração de interesse é a hemicelulose por ser constituída principalmente da pentose xilose, substrato para este bioprocessos. A hidrólise ácida diluída tem sido comumente empregada nas pesquisas para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico rico em xilose. Entretanto, neste processo ocorre também a liberação/formação de compostos tóxicos aos micro-organismos, inibidores de atividades enzimáticas como fenólicos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural além de íons metálicos. No presente trabalho, foram empregadas duas metodologias de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: elevação do pH para 7,0 com óxido de cálcio seguida do abaixamento para 2,5 com ácido fosfórico, combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (1,0% p/v, 100rpm, 30 min. a 60°C); e floculação por polímero vegetal (15% p/v, 200rpm, 15min. a 25°C). Avaliação da eficácia destes procedimentos foi feita quanto à remoção de tóxicos e à fermentabilidade do hidrolisado, avaliada pela bioconversão de xilose em xilitol empregando a levedura *Candida guilliermondii*. De acordo com os resultados, a alteração de pH combinada à adsorção com carvão ativo propiciou maior remoção de compostos fenólicos (80%), com consequente favorecimento dos parâmetros fermentativos rendimento ($Y_{P/S}=0,78\text{g/g}$) e produtividade ($Q_P=0,48\text{g/L.h}$) de xilitol, enquanto a utilização de polímero levou à maior perda dos íons cromo e ferro (superior a 90%), além de níquel. Pela avaliação das atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD), responsáveis pelos passos iniciais da bioconversão de xilose em xilitol, pode-se constatar que não há uma correlação entre as suas máximas atividades e a condição de maior remoção de tóxicos e máximos parâmetros fermentativos. Isto pode ser constatado pelo fato de que a máxima atividade da XR ($0,446\text{ U/mg}_{\text{prot}}$) foi obtida no experimento controle no qual o hidrolisado foi submetido apenas ao ajuste de pH para a fermentação (pH=5,5) enquanto para a XD esta foi máxima ($0,565\text{ U/mg}_{\text{prot}}$) com a utilização do polímero vegetal.

Palavras-chave: Polímero vegetal, Carvão ativado, Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e Xilitol.

ABSTRACT

CHAUD, L. C. S. **Evaluation of activated vegetal charcoal and vegetal polymer on the detoxification of the sugarcane hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol.** 2010. 97p. Dissertation (Master of Science)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2010.

The increasing search for ethanol fuel in order to reduce the dependence and to promote the substitution of fossil fuels will contribute to higher accumulation of sugarcane bagasse in the environment. This biomass that in Brazil is a by-product of the sugar-alcohol mills, although it has been used for the generation of energy in the sugar and alcohol production, can also be used as alternative for obtainment of xylitol, contributing to bring economical advantages for sugar-alcohol mills. In this sense, researches has been performed for the biotechnological use of sugarcane bagasse for the production of xylitol, a polyol with peculiar characteristics like its sweetener power similar to that of saccharose, non-cariogenic and indicated for diabetics and obese people, as well in the treatment of respiratory diseases and in the osteoporosis prevention. Its commercial production occurs by chemical catalysis of the xylose from the rich-xylan lignocellulosic materials, which has high cost. For the biotechnological xylitol production from these materials, initially the polymeric matrix deconstruction is necessary for separation of their main fractions: the cellulose, hemicellulose and lignin. In the case of xylitol, the fraction of interest is the hemicellulose due to be constituted mainly of pentose xylose, substrate for this bioprocess. The diluted acid hydrolysis has been commonly used in the researches for the obtainment of rich-xylose hemicellulosic hydrolysates. However, in this bioprocess there is also the release/formation of toxic compounds to the microorganisms, inhibitors of enzymatic activities like phenolics, organic acids, furfural, hidroxyethylfurfural, besides metallic ions. In the present work, two detoxification methodologies for sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate were used: increase of pH to 7,0 with calcium oxide, followed by the decrease to 2,5 with phosphoric acid combined with the active charcoal adsorption (1,0% w/v, 100rpm, 30min, 60°C); and vegetal polymer flocculation (15% w/v, 200rpm, 15min, 25°C). The efficiency of these procedures was evaluated by the toxics removal analysis and the xylose-into-xylitol bioconversion using *Candida guilliermondii* yeast. According to the results, the pH alteration combined with the active charcoal adsorption provided higher phenolic compounds removal (80%) with consequent enhance of the fermentative parameters, yield ($Y_{P/S} = 0,78\text{g/g}$) and volumetric productivity ($Q_P=0,48\text{g/L.h}$) of xylitol, while vegetal polymer provide the greatest loss of ions chrome and iron (higher than 90%), beyond zinc. Evaluating the activities of the enzymes xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XD), responsible for the initial steps of the xylose-into-xylitol bioconversion, it can be verified that there is not a correlation between their maximum activities and the condition of higher toxics removal and maximum fermentative parameters. This can be proved by the fact of the XR maximum activity ($0,446\text{ U/mg}_{\text{prot}}$) was obtained in the control experiment, in which the hydrolysate was submitted only to pH adjustment for the fermentation ($\text{pH}=5,5$), while for XD this activity was maximum ($0,565\text{ U/mg}_{\text{prot}}$) with use of vegetal polymer.

Key-words: Vegetal polymer, Activated charcoal, Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate and Xylitol.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 XILITOL	13
2.1.1 Propriedades e Aplicações	13
2.1.2 Obtenção de Xilitol	16
2.1.2.1 Via Química	17
2.1.2.2 Via Biotecnológica	18
2.1.3 Fatores que Influenciam a Bioconversão de Xilose em Xilitol	21
2.2 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	22
2.3 INIBIDORES DO METABOLISMO MICROBIANO.....	24
2.4 DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA.....	28
2.4.1 Agentes de Destoxificação Empregados	30
2.4.1.1 Carvão Vegetal Ativado	30
2.4.1.2 Alteração de pH do hidrolisado.....	31
2.4.1.3 Polímeros Vegetais.....	33
2.5 AS ENZIMAS XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 OBTENÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA	41
3.2 DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA.....	41
3.2.1 Alteração de pH e Adsorção em Carvão Vegetal Ativado	42
3.2.2 Floculação por Polímero de Origem Vegetal	42
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO.....	44
3.4 FERMENTAÇÕES	44
3.4.1 Microorganismo e Preparo do Inóculo	44
3.4.2 Meio e condições de fermentação	45
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	46
3.5.1 Viabilidade e Pureza da Cultura	46
3.5.2 Determinação da Concentração Celular	46
3.5.3 Determinação das Concentrações de Xilose, Glicose, Arabinose, Xilitol, Glicerol, Etanol e Ácido Acético	47
3.5.4 Determinação das Concentrações de Furfural e Hidroximetilfurfural	47
3.5.5 Determinação das Concentrações de Compostos Fenólicos	47
3.5.6 Determinação das Concentrações de Íons Metálicos e cálcio	48
3.5.7 Rompimento Celular	49

3.5.8 Determinação das Atividades Enzimáticas	49
3.5.9 Determinação da Concentração de Proteína Solúvel	50
3.5.10 Determinação de pH	50
3.6 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS	51
3.6.1 Rendimento ($Y_{P/S}$)	51
3.6.2 Produtividade Volumétrica em Xilitol (Q_P)	51
3.6.3 Eficiência de Conversão (η)	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	52
4.2 DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	53
4.3 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO DESTOXIFICADO	59
4.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS PROCEDIMENTOS DE DESTOXIFICAÇÃO SOBRE AS ATIVIDADES DAS ENZIMAS XILOSE REDUTASE (XR) E XILITOL DESIDROGENASE (XD) DE <i>C. guilliermondii</i>	72
5. CONCLUSÕES.....	77
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICES	91

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido por seu grande potencial de produção de recursos renováveis tais como produtos agrícolas, florestais, resíduos e subprodutos agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar. A utilização adequada deste material contribui para minimizar problemas energéticos e também ambientais em função do elevado acúmulo deste no ambiente, contribuindo ainda para geração de produtos com relevantes aplicações em diferentes segmentos industriais.

A cultura da cana-de-açúcar, em especial, tem um papel importante na economia brasileira, sendo o Brasil o maior produtor mundial e responsável por 25% da produção. Considerando que a cana processada gera um excedente considerável de bagaço, apesar de sua utilização na cogeração de energia, pesquisas têm sido realizadas no sentido de se avaliar aplicações alternativas deste subproduto, em função de seu potencial de aproveitamento no segmento de especialidades no próprio setor sucroalcooleiro. A elevada concentração de xilose na fração hemicelulósica do bagaço, o que corresponde em até 82% do total de açúcar nesta fração e a capacidade de assimilação desta pentose por diferentes micro-organismos, são os principais fatores que impulsionam o aproveitamento deste subproduto em diferentes processos de bioconversão como para a produção de xilitol. Este é um produto de alto valor agregado, de importantes aplicações clínicas e já amplamente utilizado como insumo de diversos produtos comercializados por vários seguimentos industriais como farmacêutico, alimentício e odontológico. A capacidade de conversão de xilose em xilitol já demonstrada por certas leveduras como ocorre com a *Candida guilliermondii* e as suas várias aplicações, principalmente na área de saúde, contribuem ainda mais para alavancar as pesquisas nesta área.

A utilização do bagaço em vários processos de bioconversão requer a prévia hidrólise da biomassa para separação de suas frações componentes (celulose, hemicelulose e lignina) e liberação dos açúcares. Porém, durante o processo de hidrólise ácida do bagaço, metodologia comumente empregada no caso das pesquisas quanto à produção de xilitol a partir da fração hemicelulósica do bagaço, ocorre a liberação de compostos tóxicos aos micro-organismos, o que impacta diretamente sobre o rendimento/ produtividade de xilitol, sendo, portanto, condição limitante de utilização do mesmo, a sua destoxificação.

Vários estudos têm sido feitos com a intenção de estabelecer um processo biotecnológico para a obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, recuperação do xilitol do meio fermentado e avaliação do custo deste bioprocessos que apresente rendimento semelhante ao do processo químico, método comercial pelo qual o xilitol é obtido. No entanto, os resultados das constantes pesquisas em escala laboratorial, embora promissores, não são ainda suficientes para ampliação de escala principalmente em função da produtividade do xilitol ser ainda relativamente baixa ao se comparar com o processo químico, o que poderá comprometer o oferecimento desta tecnologia ao setor sucroalcooleiro. Este fato deve-se à presença no hidrolisado, de compostos tóxicos aos micro-organismos, como fenólicos, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural, bem como de metais pesados oriundos da corrosão dos equipamentos de hidrólise. Estes se encontram presentes no meio mesmo após diferentes procedimentos de destoxificação do hidrolisado como alteração de pH, adsorção em carvão ativado, utilização de resinas de troca iônica e combinação destes procedimentos. Os resultados têm evidenciado que os diferentes procedimentos não permitem remoção total dos compostos tóxicos além de proporcionar a perda significativa de xilose, o que é indesejável, em função de ser este o substrato para a bioconversão.

Ao se comparar a utilização de carvão ativado e resina de troca iônica, sendo esta última de custo elevado, o emprego do carvão para a destoxificação de hidrolisados se apresenta como técnica promissora que poderá contribuir para o favorecimento da bioconversão de xilose em xilitol, tornando possível o oferecimento do produto a um preço acessível. Metodologias alternativas, como é o caso da utilização de polímeros vegetais, poderão, além de baratear o custo do processo de obtenção biotecnológica de xilitol, contribuir para a redução do impacto ambiental negativo por serem, os polímeros, biodegradáveis.

Considerando que pesquisas iniciais com polímeros já foram realizadas para o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, porém obtido de processo artesanal, e também as diferentes procedências do bagaço empregado em trabalhos anteriores, o que contribui para a variação da composição do hidrolisado hemicelulósico obtido, são necessárias pesquisas que possibilitem a comparação dos resultados obtidos.

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a utilização do carvão ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, no intuito de contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de obtenção de xilitol por via biotecnológica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 XILITOL

2.1.1 Propriedades e Aplicações

O xilitol (**Figura 1**) é um álcool pentahidroxiado ($C_5H_{12}O_5$), com poder adoçante semelhante ao da sacarose e superior ao de polióis comuns, além de valor calórico reduzido (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982). Aliada a estas propriedades, merece destaque a sua não cariogenicidade, uma vez que este não é assimilado pelos micro-organismos da flora bucal, principalmente pela bactéria *Streptococcus mutans*, não contribuindo assim para a formação de ácidos que atacam o esmalte dos dentes, além deste promover a remineralização dos mesmos, revertendo lesões recém formadas (SHEN *et al.*, 2001). Segundo Wen, Browngardt e Burne (2001), o mecanismo de inibição do crescimento da bactéria *S. mutans* na presença de xilitol, se deve à sua fosforilação no interior da célula, o que impede a sua metabolização, evitando a formação de cáries. Enquanto Kandelman (2003) atribui a diminuição do número de *S. mutans* na saliva e/ou na placa, à perda da capacidade de adesão destas bactérias na cavidade bucal. O papel anticariogênico do xilitol foi constatado em pesquisas com crianças em idade escolar, nas quais foi verificada a ausência de cáries, mesmo após a ingestão de doces e gomas de mascar (ALANEN; ISOKANGAS; GUTMANN, 2000; MÄKINEN *et al.*, 2001).

Figura 1 - Modelo molecular do xilitol (fonte: <http://www.3dchem.com/imagesofmolecules/Xylitol.jpg>)

O xilitol também não participa de reações do tipo Maillard por não apresentar grupos aldeídicos ou cetônicos em sua molécula, responsáveis pelo escurecimento e redução do valor nutricional de proteínas, o que possibilita seu uso na indústria alimentícia, no processamento de produtos em que estas reações não são desejáveis (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973).

Uma outra característica importante do xilitol é o seu metabolismo independente de insulina, tornando-o um substituto de outros açúcares na dieta de diabéticos (PEPPER; OLINGER, 1988). Este açúcar também pode ser empregado no tratamento de outras desordens metabólicas como a deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (WANG; PATTERSON; van EYS, 1971) e na obesidade, uma vez que a sua utilização na dieta de obesos exerce pequena contribuição para a formação de tecidos gordurosos quando comparado a outros açúcares (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973). Em estudos realizados com ratos foi constatado que a ingestão de xilitol reduziu o ganho de peso e o consumo de alimento com conseqüente diminuição dos níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol nestes animais (ELLWOOD *et al.*, 1999).

Outras aplicações clínicas do xilitol demonstradas em ratos, foram a capacidade deste em impedir a progressão da osteoporose e proporcionar aumentos da massa óssea e melhoria das propriedades biomecânicas de ossos enfraquecidos naqueles animais (MATTILA; KNUUTTILA; SVANBERG, 1998), o que torna o xilitol um forte concorrente para uma nova alternativa no tratamento clínico na prevenção desta doença. Segundo Mattila, Kamgasmaa e Knuuttila (2005), a administração simultânea de xilitol e etanol em ratos, aumentou o volume ósseo e o conteúdo mineral dos mesmos.

Pesquisas também têm sido feitas quanto à aplicação do xilitol no tratamento da fibrose cística, uma doença que afeta principalmente os pulmões e o sistema digestivo (ZABNER *et al.*, 2000). Esses autores constataram em testes com humanos, que o uso inalatório do xilitol em “spray” resultou na diminuição da concentração salina da camada

superficial da membrana respiratória, o que favoreceu a imunidade própria desta superfície e, como consequência, reduziu o número de bactérias do gênero *Staphylococcus* coagulase-negativa na cavidade nasal de voluntários, diminuindo o risco de infecções bacterianas pulmonares. Sajjan *et al.* (2004) relataram que o xilitol inibiu o crescimento da bactéria *Burkholderia cepaciae*, uma das principais bactérias responsáveis por infecções e morte em pacientes com fibrose cística .

O xilitol tem também a sua eficácia comprovada no tratamento de pacientes com otite e isto é atribuído à inibição do crescimento de *Streptococcus pneumoniae* em função do impedimento da adesão desta bactéria sobre as células nasofaríngeas. Esta propriedade foi observada em experimentos clínicos em crianças, onde o xilitol mostrou-se eficaz na prevenção do desenvolvimento de otite, com a utilização de uma dose variando entre 8,4 a 10g/dia dividida em cinco porções (UHARI; TAPIAINEN; KONTIOKARI, 2001; TAPIAINEN *et al.*, 2002). Estes autores observaram ainda que o uso de xilitol na prevenção desta doença reduziu consideravelmente a utilização de antibióticos empregados no tratamento, contribuindo para a redução de um problema mundial, que é a resistência de bactérias a agentes antimicrobianos causada justamente pelo uso descontrolado dos mesmos.

A combinação do xilitol com farnesol tem sido também testada como forma de controlar o balanço da microbiota da pele, pela inibição da formação de biofilme da bactéria *Staphylococcus aureus* além de dissolver aquele já existente (MASAKO *et al.*, 2005a e b). É importante ressaltar, que estes autores não observaram a inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus epidermidis*, a qual é a principal constituinte da microflora da epiderme de pessoas saudáveis, protegendo-as contra o crescimento de bactérias patogênicas.

O xilitol é bem tolerado pelo corpo humano podendo ser consumido até 20g por dose, ou 60g por dia se ingerido em várias porções. A ingestão acima dessa concentração pode resultar em efeito laxativo devido ao desbalanço osmótico causado no intestino grosso

pela baixa taxa de assimilação (EMODI, 1978; CULBERT *et al.*, 1986). Em organismos superiores, o metabolismo de xilitol ocorre principalmente no fígado, onde pode ser transformado em glicose a uma taxa entre 20 e 80%, dependendo da necessidade, e uma vez que sua absorção é lenta, ele pode ser metabolizado indiretamente pela biota intestinal (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a).

Quanto à segurança do consumo e utilização por humanos, o xilitol já é aceito pela *European Economic Community* – EEC desde 1984, enquanto a *Food and Drug Administration* – FDA dos Estados Unidos o classifica como “geralmente reconhecido como seguro” (*Generally Regarded as Safe* – GRAS) desde 1986 e “seguro para os dentes” (*Safe for Teeth*) desde 1994. A *Joint Expert Comittet on Food Additives* (JECFA), uma divisão prestigiada da *World Health Organization*, classificou o xilitol como aceitável para consumo diário (*Acceptable Daily Intake* – ADI).

Todas as características apresentadas pelo xilitol têm garantido seu uso com demanda crescente nas indústrias alimentícia, farmacêutica e odontológica em países como Alemanha, Argentina, Bélgica, Canadá, Estados Unidos, Finlândia, França, Holanda, Inglaterra, Japão, México, Suécia, Suíça e Rússia (CCC, 2007). Como resultado dessa crescente demanda, o mercado de polióis na Europa comercializou em 2005 cerca de US\$ 577,8 milhões. No Brasil, a sua utilização está voltada principalmente para produtos como creme dental, gomas de mascar e pastilhas. Por outro lado, dados recentes apontam que cerca de 80 a 90% das gomas de mascar vendidas na Ásia têm xilitol nas suas formulações (CCC, 2007).

2.1.2 Obtenção de Xilitol

O xilitol é encontrado naturalmente em frutas e legumes, leveduras, líquens, algas e pode ser recuperado destas fontes por extração sólido-líquido. Porém, sua baixa proporção

nestes materiais (900mg/100g) torna este processo de obtenção economicamente inviável (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982; PEPPER, OLINGER, 1988).

A produção comercial de xilitol ocorre por processo químico, porém a via biotecnológica de produção deste poliol vem sendo extensivamente estudada a fim de se obter rendimento semelhante ao proporcionado pelo processo químico (50-60% baseado na conversão da xilose inicial) e diminuir os altos custos dos processos de recuperação e purificação, que limitam a utilização comercial deste adoçante (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a).

2.1.2.1 Via Química

O processo químico de obtenção de xilitol iniciou-se na Finlândia pela Finnish Sugar Co. Ltda., Helsink, com capacidade para produzir acima de 3000 ton/ano, processo patenteado em 1977 (Patente # 4.008.285) (MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977). Este processo consiste na hidrogenação catalítica da xilose pura obtida por meio da hidrólise de materiais lignocelulósicos (**Figura 2**). De modo geral, são necessárias quatro etapas básicas para a realização do processo químico: (1) desintegração de materiais lignocelulósicos ricos em xilana por hidrólise ácida, (2) separação da xilose do hidrolisado, por cromatografia, para a obtenção de uma solução de xilose de elevada pureza, (3) hidrogenação catalítica da xilose pura em xilitol na presença de níquel como catalisador e (4) purificação e cristalização do xilitol (MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977).

O rendimento do processo químico, bem como a qualidade do xilitol, são dependentes da pureza da solução inicial de xilose, uma vez que a presença de impurezas interfere no processo de catálise. Além disto, a produção de xilitol por via química exige várias etapas de purificação para remoção de resíduos do catalisador, o qual é um metal tóxico

e prejudicial à saúde humana, e de subprodutos gerados durante o processo de hidrogenação (MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977), resultando no aumento de tempo de processamento e encarecimento do produto, sendo difícil alcançar alto rendimento pela quantidade considerável de subprodutos formada e pelo alto custo dos processos de recuperação e purificação do xilitol (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a).

Figura 2- Esquema simplificado do processo de produção de xilitol por via química baseado em Melaja; Hämäläinen, 1977.

2.1.2.2 Via Biotecnológica

Como alternativa ao processo químico, pesquisas têm sido conduzidas para o desenvolvimento de processos biotecnológicos utilizando microorganismos para a conversão de xilose em xilitol sem a necessidade de uso de solução inicial de xilose pura (SILVA *et al.*, 1996; FELIPE *et al.*, 1997a; SENE *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2003a; SILVA *et al.*, 2004a). Vários micro-organismos são capazes de converter xilose em xilitol, destacando-se as

leveduras, particularmente espécies de *Candida*, pela maior eficiência de conversão, conforme demonstrado na **Tabela 1**.

Tabela 1- Leveduras identificadas como produtoras de xilitol a partir de xilose (Adaptado de Winkelhausen e Kuzmanova (1998)).

Levedura	Xilitol (g/L)
<i>C. guilliermondii</i> FTI- 20037	37,0
<i>C. mogii</i> ATCC 18364	31,0
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 34078	20,0
<i>C. tropicalis</i> ATCC 7349	20,0
<i>C. tropicalis</i> 1004	17,0
<i>C. intermedia</i> RJ- 248	5,7
<i>C. tropicalis</i> ATCC 20240	5,5
<i>C. tropicalis</i> HXP 2	4,8
<i>C. pseudotropicalis</i> IZ- 431	4,3
<i>C. utilis</i> C- 40	3,0
<i>C. boidinii</i> NRRL Y- 17213	2,9
<i>C. tropicalis</i>	2,1
<i>C. utilis</i> ATCC 22023	1,8
<i>Debaryomyces hansenii</i> C- 98 M- 21	0,8
<i>Hansenula anomala</i> IZ- 1420	6,1
<i>Kluyveromyces marxianus</i> IZ- 1821	6,1
<i>Kluyveromyces fragilis</i> FTI- 20066	4,6
<i>Pichia (Hansenula) anomala</i> NRRL Y- 366	2,0
<i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y- 2460	2,2
<i>Saccharomyces</i> SC- 37	2,3
<i>Saccharomyces</i> SC- 13	0,7
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 16979	0,2

Poucas informações são encontradas na literatura quanto às pesquisas com fungos filamentosos e bactérias produtoras de xilitol, mas há relatos de trabalhos com fungos filamentosos como os dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Glicocladium*, *Byssoschlamys*, *Myrothecium*, *Neurospora*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* (CHIANG; KNIGHT, 1960), *Petromyces albertensis* (DAHIYA, 1991), *Mucor* e *Fusarium* (PARAJO; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a) e bactérias, como *Corynebacterium* sp., *Enterobacter liquefaciens* e *Mycobacterium smegmatis* (WINKELHAUSEN, KUZMANOVA, 1998).

A **Figura 3** ilustra o processo de obtenção de xilitol por via biotecnológica que, semelhante ao químico, inicialmente requer a etapa de hidrólise do material lignocelulósico rico em xilana.

Figura 3-Esquema simplificado da via biotecnológica de obtenção de xilitol.

No processo biotecnológico é necessária a etapa de concentração do hidrolisado para aumentar o teor de xilose, além da etapa de destoxificação para reduzir a concentração de compostos tóxicos resultantes do procedimento de hidrólise, seguida da fermentação do hidrolisado hemicelulósico (FELIPE, 2004) e recuperação do xilitol (SANTOS, 2004; MARTINEZ, 2005).

2.1.3 Fatores que Influenciam a Bioconversão de Xilose em Xilitol

A bioconversão de xilose em xilitol pode ser influenciada por diversos fatores, que podem modificar o metabolismo de leveduras. Até o momento já foram identificados alguns parâmetros responsáveis pelo favorecimento da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* durante fermentação de hidrolisados hemicelulósicos como concentração (0,1 a 1,0 g/L) e idade do inóculo (24 h) (FELIPE *et al.*, 1997a), pH (5,5 a 6,5) (FELIPE *et al.*, 1997b); temperatura (30 °C) (FELIPE *et al.*, 1997a; SENE *et al.*, 2000), concentração de xilose (50 a 60 g/L) (FELIPE *et al.*, 1997a), relação glicose:xilose (1:5) (SILVA; FELIPE, 2006), concentração de ácido acético (LIMA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004b). Também a adaptação e reciclagem do inóculo ao próprio hidrolisado (MATOS, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2006), bem como o preparo do inóculo na presença de baixa concentração de glicose (SILVA, 2004; SILVA; FELIPE, 2006) ou arabinose (MATOS, 2004) junto à xilose foram condições de fermentação que propiciaram o favorecimento da produção de xilitol nas pesquisas realizadas com *C. guilliermondii*. Com relação à agitação, a condição mais empregada em frascos (125ml, contendo 50ml de meio) tem sido 200 rpm (FELIPE *et al.*, 1997a; SENE *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2004b). Quanto ao oxigênio, a utilização de um coeficiente volumétrico de transferência de O₂ (K_{La}) de 22,5 h⁻¹ foi empregado durante pesquisas em fermentador de bancada (MORITA; SILVA, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2003b). Nestas condições, Morita e Silva (2000) encontraram maior produtividade (0,72 g/L.h) e rendimento em xilitol (0,71 g/g) em pH 7,0, o que correspondeu a 77% de eficiência de conversão, enquanto os valores obtidos nas pesquisas realizadas por Rodrigues *et al.* (2003b) foram de 0,64 g/g (correspondente a 70% de eficiência de conversão) e 0,76 g/L.h, porém em pH 5,5.

É importante considerar ainda que os hidrolisados contêm, além de açúcares, compostos tóxicos como fenóis, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural, os quais interferem nesse bioprocesso em função das concentrações em que se encontram no meio (FELIPE; VITOLO; MANCILHA, 1996; ALVES *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2001; MARTON; FELIPE; ALMEIDA e SILVA, 2003; VILLARREAL *et al.*, 2006).

2.2 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A cultura da cana-de-açúcar tem um papel importante na economia brasileira, sendo o Brasil o maior produtor mundial e responsável por 25% da produção, sendo o Estado de São Paulo responsável por 60% do total (RANKBRASIL, 2007). Segundo levantamento realizado pela ÚNICA (União da Indústria de Cana-de-Açúcar), a próxima safra de cana (2009/2010) deverá ser a maior da história com 550 milhões de toneladas colhidas, 8,18% a mais que a safra anterior (AGROSOFT BRASIL, 2009).

Considerando que cada tonelada de cana processada tem o potencial de gerar 250 kg de bagaço (com 50% de umidade) e que o aproveitamento do bagaço nos setores sucroalcooleiros para geração de energia fica em torno de 70 a 90% (CETESB, 2009), o excedente deste subproduto ainda é enorme o que tem impulsionado as pesquisas na busca de alternativas de seu aproveitamento.

As fibras do bagaço da cana (**Figura 4**) contêm, como principais componentes, cerca de 40% de celulose, 35% de hemicelulose e 15% de lignina (RODRIGUES, 2005). A celulose é um polímero linear constituído por unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1 $\rightarrow$ 4, enquanto a hemicelulose é um heteropolímero composto predominantemente por hexoses e pentoses com curtas ramificações, tais como D-xilose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose e a lignina é uma macromolécula polifenólica, constituída por unidades básicas de

3-5-dimetoxi-4-hidroxi-fenilpropano, 3metoxi-4-hidroxi-fenilpropano e 4-hidroxi-fenilpropano (FENGEL; WEGENER, 1989). A elevada concentração de xilose na fração hemicelulósica do bagaço, o que corresponde em até 80% do total de açúcar nesta fração (RODRIGUES *et al.*, 2001) e a capacidade de assimilação desta pentose por várias leveduras (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998), são fatores que contribuem para a busca de alternativas de utilização do bagaço de cana em processos de bioconversão.

Para a utilização do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes processos de bioconversão, em particular para a produção de xilitol, é necessária a liberação de seus açúcares da fração hemicelulósica. Para isto podem ser empregados diferentes procedimentos de hidrólise e embora a literatura apresente processos tais como a hidrólise alcalina e a enzimática, a hidrólise ácida tem sido a mais empregada nas pesquisas para a produção biotecnológica de xilitol a partir de diferentes materiais lignocelulósicos (FELIPE, 2004).

Figura 4 - Modelo representativo da fibra do bagaço de cana-de-açúcar.

Na hidrólise ácida, utiliza-se geralmente H_2SO_4 (ácido sulfúrico), sendo as temperaturas e durações dos tratamentos variáveis segundo as tecnologias empregadas. O líquido resultante do processo contém açúcares, essencialmente pentoses provenientes da hidrólise da hemicelulose, enquanto o resíduo sólido contém a parte celulósica e a lignina

(POURQUIE; VANDECASTEELE, 1985). Durante o processo, ocorre também a liberação de subprodutos indesejáveis ao processo fermentativo, devido à degradação tanto de açúcares, provenientes da fração celulósica e hemicelulósica, como também da lignina, onde se destacam o furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético e compostos fenólicos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Outros tóxicos em potencial, presentes nos hidrolisados são os íons metálicos provenientes dos equipamentos de hidrólise (WATSON *et al.*, 1984).

2.3 INIBIDORES DO METABOLISMO MICROBIANO

Efeitos inibitórios da atividade microbiana podem ocorrer em função da presença de compostos tóxicos aos micro-organismos nos hidrolisados hemicelulósicos, sendo que tais efeitos dependem não só do tipo e concentração dos compostos, mas também da atuação sinérgica entre eles (FELIPE, 2004). Pesquisas com a levedura *C. guilliermondii* revelaram que o aumento da concentração de ácido acético no meio a valores superiores a 3,0g/L interferiu negativamente na bioconversão de xilose em xilitol por esta levedura, durante fermentações realizadas em meio sintético, enquanto a presença de baixas concentrações deste ácido (1,0g/L) favoreceu este metabolismo sendo a levedura capaz de assimilar todo o ácido durante o processo (FELIPE *et al.*, 1995). Estes autores atribuíram esta ocorrência ao fato de parte deste ácido poder entrar diretamente no ciclo de Krebs via acetil-CoA, enquanto concentrações maiores poderiam ser utilizadas por outras vias metabólicas dependentes de energia, como o ciclo do glioxilato, resultando em falta de energia para a manutenção do metabolismo da levedura. No caso das fermentações em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, Lima *et al.* (2004) também verificaram a redução dos parâmetros

rendimento e produtividade volumétrica de xilitol por *C. guilliermondii* em função do aumento da concentração de ácido acético no meio de 5 para 10g/L.

Quanto à inibição do crescimento microbiano exercido por altas concentrações de ácido acético, Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000) atribuem este efeito à entrada do ácido não dissociado no citossol celular. Estes autores propõem algumas teorias para o efeito deste ácido como a diminuição do pH intracelular (resultante da dissociação do mesmo no citossol) e do efeito tóxico da forma aniônica do ácido. Para manter o pH neutro do citossol e consequentemente a viabilidade celular, a célula utiliza a ATPase da membrana plasmática, a qual bombeia prótons para fora da célula com gasto de ATP. Em altas concentrações ácidas a capacidade de bombear o próton da célula é esgotada resultando em exaustão de ATP, dissipação da força próton motora e acidificação do citoplasma em função do acúmulo de prótons no meio intracelular (PALMQVIST E HAHN-HÄGERDAL, 2000).

No caso dos compostos fenólicos, os quais exercem um efeito inibitório considerável nas fermentações de hidrolisados hemicelulósicos, causam perda da integridade da membrana biológica, afetando sua habilidade de barreira seletiva e matrizes enzimáticas, observando-se a diminuição da inibição da fermentação quando monômeros de ácidos fenólicos são significativamente removidos do hidrolisado (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Felipe *et al.* (1999) avaliando o efeito tóxico do fenol durante a fermentação em meio semi sintético por *C. guilliermondii* verificaram que a presença de baixa concentração (0,05 g/L) deste composto foi suficiente para reduzir drasticamente a produtividade de xilitol. Segundo estes autores, isto se deve provavelmente à inibição da atividade da xilose redutase ou transporte de xilose através da membrana plasmática, já que a assimilação de xilose foi também drasticamente afetada.

Os efeitos tóxicos de alguns compostos fenólicos como hidroquinona (0,25-3,0 g/L), siringaldeído (0,25-1,50 g/L) e 4-metilcatecol (0,25-1,0 g/L) foram também avaliados em

Debaryomyces hansenii CCMII 941, durante a fermentação de um meio quimicamente definido simulando a composição de hidrolisado hemicelulósico rico em pentose (DUARTE *et al.*, 2005). Esses autores encontraram uma correlação negativa entre a produtividade de xilitol e a presença de compostos fenólicos no meio, além de verificarem que a presença destes compostos resultou em menor assimilação de xilose se comparada ao meio ausente dos mesmos.

Quanto ao furfural e 5-hidroximetilfurfural, estudos revelaram que para *C. guilliermondii* o cultivo desta em batelada, em condições aeróbias na presença de diferentes concentrações destes compostos, resultou em inibição da atividade microbiana (DUARTE *et al.*, 2005). Estes autores constataram a inibição do crescimento celular, de 30,3; 70,0 e 100% com adição no meio de 1,0; 1,5 e 2,0 g/L de furfural, respectivamente, sugerindo ser o furfural um inibidor do crescimento mais forte do que o 5-hidroximetilfurfural. Estes autores também observaram que a capacidade desta levedura em metabolizar estes componentes é diferente, em função da velocidade de assimilação, uma vez que o furfural é consumido mais rapidamente em relação ao 5-hidroximetilfurfural. Segundo os autores, isto sugere que as enzimas para o metabolismo de furfural possam ser constitutivas na levedura. Ainda de acordo com esses autores, o furfural e 5-hidroximetilfurfural atuam em enzimas como triose-fosfato desidrogenase e álcool-desidrogenase.

Com relação aos íons metálicos, Camilotti *et al.* (2007) em recentes pesquisas, encontraram que podem ser provenientes da própria cana-de-açúcar, como o cromo detectado no colmo e no palmito, enquanto o níquel no palmito e nas folhas e o chumbo em todas as partes avaliadas da cana. Além disso, estudos revelaram que o reator de aço inoxidável utilizado durante o preparo de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, é uma fonte em potencial de liberação destes, como cátions de ferro, cromo e níquel, uma vez que as concentrações destes cátions presentes no hidrolisado preparado em reator de plástico,

resistente ao calor, foram consideravelmente menores (WATSON *et al.*, 1984). Estes autores verificaram ainda em fermentações com *Pachysolen tannophilus* que os íons níquel e cromo nas concentrações de 0,01 g/L inibiram fortemente o crescimento desta levedura e a produção de etanol durante fermentação de meio contendo 10 g/L xilose, ao contrário do observado para o íon cobre nesta mesma concentração, em função do efeito tóxico ter sido menos evidenciado em relação aos demais íons. Enquanto para *Candida sp.* cultivada em meio contendo glicose como fonte de carbono (30g/L), pesquisas revelaram ser esta levedura mais sensível ao íon níquel do que ao cobre, sendo seu crescimento totalmente inibido quando a concentração de níquel foi 0,508g/L (DÖNMEZ; AKSU, 2001).

Em relação ao zinco, pesquisas com *D. hansenii* revelaram forte inibição da enzima xilitol desidrogenase quando a concentração deste no meio foi de 0,75mM adicionado na forma de cloridrato de zinco (GIRIO; PELICA; COLAÇO, 1996).

Durante a fermentação de meios sintéticos ou contendo hidrolisado de bagaço de cana, por *C. guilliermondii*, alguns autores constataram a formação dos subprodutos glicerol e etanol (CARVALHO JUNIOR *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007 ; ARRUDA ; FELIPE, 2009). Segundo Arruda e Felipe (2009), a maior formação de glicerol está relacionada à condição de maior teor de tóxicos presentes no meio fermentativo, já que sua formação se deve a um provável mecanismo de defesa da levedura em condições de estresse celular. Enquanto Silva *et al.* (2007) observaram a diminuição da concentração de glicerol e etanol, principalmente quando os açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço foram depletados, sugerindo a utilização destes subprodutos como fonte de carbono e energia,.

2.4 DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA

É importante destacar que as pesquisas realizadas com *C. guilliermondii* durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço foram sempre feitas em hidrolisado destoxificado por diferentes procedimentos. Estes métodos foram sendo empregados, individuais ou combinados entre si, com destaque para a alteração do pH do hidrolisado com bases e ácidos (ROBERTO *et al.* 1991) e a associação deste à adsorção em carvão ativo (ALVES *et al.*, 1998; MARTON *et al.*, 2003; MARTON *et al.*, 2006).

Os resultados das pesquisas iniciais para a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, demonstraram que o tratamento com bases e ácidos propiciou a melhoria da fermentabilidade do hidrolisado (ROBERTO *et al.*, 1991), enquanto a combinação deste tratamento com adsorção em carvão ativo se apresentou como alternativa de tratamento (ALVES *et al.*, 1998). Mais tarde, a avaliação de diferentes tipos de carvão ativo de marcas nacionais sobre o tratamento do hidrolisado de bagaço de cana, revelou o efeito positivo deste método na remoção dos compostos tóxicos: ácido acético, fenólicos, furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), sendo que a marca do carvão não interferiu significativamente nesta remoção, tendo-se ainda observado elevada perda de xilose (MARTON *et al.*, 2003). Durante estas pesquisas não foram avaliados os efeitos desta metodologia sobre a remoção de íons metálicos. Por outro lado, as condições de adsorção interferiram tanto na remoção de compostos tóxicos quanto na de xilose, não se encontrando uma condição de destoxificação favorável para a remoção de todos os compostos tóxicos avaliados (MARTON *et al.*, 2003).

Em continuidade a estas pesquisas, tendo em vista a necessidade de se avaliar um sistema contínuo de destoxificação do hidrolisado de bagaço a partir de um sistema de tratamento que combinasse adsorção em carvão ativo e utilização de resinas de troca iônica,

foi proposta a avaliação em um sistema composto por colunas de vidro avaliando-se diferentes condições operacionais (CARVALHO JUNIOR *et al.*, 2005). Os resultados desta pesquisa, entretanto, não diferiram muito dos já obtidos anteriormente, exceto na facilidade de operação do sistema por ser contínuo, pois a redução do teor de fenólicos e ácido acético ficou próximo de 98 e 50% respectivamente, com perda de 22% de xilose. A clarificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço foi constatada por ambos os métodos, alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo (MARTON *et al.*, 2003) e combinação de resinas de troca iônica e carvão ativo (CARVALHO JUNIOR *et al.*, 2005)

De modo geral, esses tratamentos, embora tenham propiciado a redução da concentração de compostos tóxicos, acarretaram em perda de açúcares da ordem de 18 a 60%, conforme constatado por Carvalho Júnior *et al.* (2005) e Marton *et al.* (2003), respectivamente, além de contribuírem para a geração de resíduo com impacto negativo ao ambiente.

Uma alternativa à utilização dos procedimentos de destoxificação anteriormente avaliados consiste na utilização de polímeros vegetais, proposta recentemente como uma nova estratégia, simples, de baixo custo e ambientalmente correta pela biodegradabilidade do polímero (SILVA; HASMAN; FELIPE, 2007). Nestas pesquisas constatou-se a eficácia do polímero na redução da concentração de compostos tóxicos, como a perda de 61% de fenóis totais e somente 0,33% de perda de xilose (SILVA, 2006).

2.4.1 Agentes de Destoxificação Empregados

2.4.1.1 Carvão Vegetal Ativado

O carvão vegetal é uma estrutura carbônica, que pode ser submetida a processos de ativação para adquirir, principalmente, a melhoria da propriedade de adsorção, causada pelo aumento da área superficial de suas partículas. Em razão das propriedades adsorventes, o carvão ativado pode ser empregado em processos industriais de descoloração, tratamento de efluentes e de água, tratamento e purificação de soluções açucaradas, anestésicos, antibióticos, álcoois e na remoção de sabores e odores de alimentos (GREENBANK; SPOTTS, 1995). A estrutura interna do carvão, segundo Biniak, Swiatkowski e Pakula (2001), é formada por associações de anéis aromáticos, heterocíclicos e outros grupos funcionais, predominantemente formados por carbono, oxigênio e hidrogênio (**Figura 5**). Segundo este autor, a característica responsável pelo potencial de adsorção do carvão ativado é sua estrutura porosa, que pode ser constituída por poros de diferentes tamanhos.

As propriedades físico-químicas do carvão ativo são obtidas durante o processo de fabricação em que ocorre a ativação do carvão, o qual adquire durante este processo a propriedade de adsorção física (MARTON, 2002). Por meio do aquecimento a altas temperaturas (500-1000°C), com ou sem a adição de produtos químicos, há eliminação dos constituintes voláteis e formação da estrutura porosa rudimentar, que irá conferir poros mais largos, aumentando o volume do material. As características adquiridas neste processo são determinantes para a ação do carvão, além de outros fatores como a temperatura, tempo de contato, agitação, pH e concentração (MARTON, 2002).

Figura 5- Estrutura carbônica do carvão vegetal ativado, com grupos funcionais ativos em sua superfície (detectados por análise espectroscópica de infra vermelho e difração de raios X): (a) aromático, (b) e (c) carboxil-carbonatos, (d) ácido carboxílico, (e) e (f) lactonas cíclicas, (g) e (h) éteres cíclicos, (i) e (j) anidridos cíclicos, (k) quinona, (l) fenol, (m) álcool e (n) cetona (BINIAK; SWIATKOWSKI; PAKULA, 2001).

2.4.1.2 Alteração de pH do hidrolisado

Métodos químicos de tratamento dos hidrolisados hemicelulósicos, como a precipitação de compostos tóxicos com bases e ácidos são bastante empregados para diminuir o grau de toxicidade destes hidrolisados (FRAZER; MCCASKEY, 1989; ROBERTO *et al.* 1991; ALVES *et al.*, 1998; CARVALHO JÚNIOR, 2005). Segundo Frazer e MacCaskey (1989) em pesquisas com hidrolisado hemicelulósico da madeira, foi constatada a eficácia deste procedimento, principalmente na remoção de compostos fenólicos, metais pesados e furanos. Estes autores atribuem este fato a que o ajuste de pH com Ca(OH)_2 mantém acetatos

e ácidos em sua forma não protonada, que pode ser considerada menos tóxica para os microrganismos.

De acordo com Roberto *et al.* (1991) combinação de bases e ácidos empregada para o ajuste de pH do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana é um tratamento de baixo custo que produz bons resultados, principalmente quando realizado com sais de cálcio (Ca(OH)_2 e CaO), em virtude de sua baixa solubilidade. Estes autores observaram que a efetividade deste método se deve primeiramente à remoção de compostos fenólicos e em segundo lugar à remoção de íons metálicos, que são tóxicos aos microorganismos.

Alves *et al.* (1998) empregaram diferentes combinações de bases (Ca(OH)_2 ou CaO) e ácidos (H_2SO_4 ou H_3PO_4) para alterar o pH inicial do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, com e sem carvão ativado. Maior remoção de furfural e hidroximetil furfural (HMF) foi observada quando o pH do hidrolisado foi aumentado para 7,0 com CaO e então diminuído para 5,5 com H_3PO_4 , ao qual foi adicionado 2,4% de carvão ativado. Entretanto, segundo estes autores, a concentração de ácido acético não foi significativamente afetada.

Por outro lado, Carvalho Júnior *et al.* (2005) obtiveram melhores resultados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, destacando-se após a etapa de utilização de CaO e H_3PO_4 , a diminuição do pH para 2,5 com H_2SO_4 , além do emprego de menor concentração de carvão ativado (1%). Estes autores observaram remoção de 100% de furfural e HMF, além da remoção de aproximadamente 55 e 80% de ácido acético e compostos fenólicos respectivamente. Além disso, os autores relataram que durante a fermentação do hidrolisado destoxificado por este método, verificou-se consumo de 99% de xilose após 72h. de cultivo da levedura *C. guilliermondii*, motivando a escolha deste como um dos métodos de destoxificação a ser utilizado no presente trabalho.

2.4.1.3 Polímeros Vegetais

Alguns biopolímeros naturais vêm sendo investigados para o tratamento de águas para fins potáveis e residuárias, com o intuito de prescindir da utilização de floculantes compostos por sais de ferro e alumínio que são poluentes (HEREDIA; MARTÍN, 2009). Segundo Cruz (2004) estes biopolímeros são utilizados principalmente por indústrias petroquímicas e abatedouros de aves, devido às suas propriedades de aglomeração de impurezas. Estes polímeros são compostos basicamente de taninos obtidos da casca de árvores como Juá, Tamarindo e Mimosa, além do mesocarpo de Babaçu (CRUZ, 2004). Segundo Bate-Smith; Swain (1962), taninos são compostos polifenólicos de alta massa molar (500-3000 g/mol), que apresentam propriedades especiais como precipitação de alcalóides, gelatinas e outras proteínas. Estes compostos possuem características adstringentes e são tradicionalmente utilizados na indústria do couro, como agentes de curtimento (CRUZ, 2004).

Os taninos podem ser divididos em 02 grandes classes: os hidrolisáveis e os condensados, sendo, os primeiros, compostos por galatoninas e elagitaninos. Os taninos condensados (**Figura 6**) são compostos por poliflavonóides e são os mais amplamente distribuídos na natureza (DE BRUYNE *et al.*, 1999), sendo a segunda fonte de polifenóis do reino vegetal, perdendo apenas para a lignina. Estes taninos podem ser encontrados em raízes, folhas, frutos e cascas de plantas (QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002). De acordo com De Bruyne *et al.* (1999), os taninos apresentam propriedades antimicrobianas e antivirais, provavelmente pelo efeito de complexação entre os polifenóis e as proteínas, podendo causar inibição enzimática.

O tanino condensado, geralmente extraído da casca de Acácia Negra (*Acacia mearnsii*) é o mais utilizado como floculante, por ser mais viscoso que o hidrolisável (SILVA, 1999), o qual sofre modificações para compor o polímero vegetal, as quais consistem na

agregação de grupos catiônicos a esta molécula (ACQUAQUÍMICA, 2005). A concentração de taninos no polímero vegetal é o que confere suas aplicações, sendo que quando estão presentes na faixa entre 6,5-7,3% são utilizados como sanitizantes em moendas de indústrias açucareiras e na concentração de 18%, são normalmente utilizados como floculantes em tratamentos de efluentes industriais (ACQUAQUÍMICA, 2005).

Figura 6 - Fórmulas estruturais de (a) um flavonóide genérico, (b) flavan-3-ol e (c) procianidina (tanino condensado). Adaptado de Queiroz *et al.* (2002).

Segundo Acquaquímica (2007), os polímeros atuam em sistemas de partículas coloidais, neutralizando cargas e formando pontes entre elas, por atração iônica e interação superficial, o que leva à formação de flocos com rápida precipitação (**Figura 7**).

Heredia e Martín (2009) encontraram que o uso de polímeros vegetais como agentes floculantes no tratamento de águas residuárias, requer somente o ajuste de pH, podendo ser utilizados em baixas dosagens, o que torna o processo mais econômico. Segundo estes autores, estes compostos, à base de taninos condensados, podem remover alguns metais da superfície da água, como: cobre, zinco e níquel.

Figura 7 - Esquema representativo da flocculação por polímero à base de tanino vegetal (Adaptado de Silva (2006)).

Quanto à utilização de polímeros vegetais na destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos, há poucos relatos na literatura. Silva (2006), pesquisando a destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de origem artesanal, observou que polímeros vegetais à base de tanino são uma alternativa aos métodos comumente empregados para a remoção de compostos tóxicos, inibidores do metabolismo microbiano. Este autor verificou que a maior concentração de xilitol no meio de fermentação, coincidiu com a condição de maior remoção de íons ferro, cromo e zinco, com o emprego de polímero vegetal com o menor teor de taninos (6,5-7,3%). Enquanto o tratamento do hidrolisado hemicelulósico com o polímero com maior teor de taninos (18%), que propiciou a maior remoção de compostos fenólicos, 5-hidroximetilfurfural e íons níquel, não favoreceu a produção de xilitol.

Os polímeros são de fácil aplicação e prontos para uso, não requerendo diluições e misturas, além de apresentarem baixo custo e serem biodegradáveis, podendo ser compostados para uso como adubo orgânico. A biodegradação dos polímeros é um processo no qual, bactérias e fungos utilizam suas enzimas para consumir substâncias destes materiais, modificando sua forma original, até a degradação total em água, CO₂ e biomassa (VINAGRE; ESPÓSITO, 2004).

2.5 AS ENZIMAS XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE

As enzimas xilose redutase (XR) (EC 1.1.1.21) e xilitol desidrogenase (XD) (EC 1.1.1.9), catalisam os primeiros passos da via metabólica das pentoses fosfato em eucariotos, sendo que os microorganismos que possuem esta via ativa são capazes de converter a xilose (presente em hidrolisados hemicelulósicos) em xilitol (SENE *et al.*, 2001).

A purificação e parcial caracterização da xilose redutase (XR) de várias leveduras e fungos revelou que a maior parte destas enzimas são monoméricas, com peso molecular variando de 33 a 40KDa, conforme ocorre com a XR de *Pachysolen tannophilus* (DITZZELMULLER *et al.*, 1984; BOLEN; DETROY, 1986). Contudo, as enzimas de *Pichia stipitis* (RIZZI *et al.*, 1988) e *Candida tropicalis* (YOKOYAMA *et al.*, 1995) consistem de duas subunidades idênticas.

Com relação à xilitol desidrogenase (XD), Yang e Jeffries (1990), ao purificar a enzima de *Candida shehatae*, verificaram que ela apresentou um peso molecular de 82KDa e de 40KDa na forma desnaturada, indicando ser esta enzima composta por duas subunidades. Segundo Rizzi *et al.* (1988), a XD de *P. stipitis* apresentou peso molecular de 63KDa, sendo 32KDa cada subunidade.

Bicho *et al.* (1988), ao investigar o efeito de diferentes fontes de carbono sobre as atividades enzimáticas de XR e XD de *P. tannophilus* e *P. stipitis* encontraram que D-glicose e D-manose podem inibir a indução enzimática promovida pela D-xilose em vários graus, enquanto celobiose, D-galactose e L-arabinose não foram inibitórias. No caso de *Candida guilliermondii*, Lee *et al.* (1996) encontraram que repressão das atividades enzimáticas de XR e XD ocorreu na presença de D-manose, D-glicose e D-frutose, enquanto D-xilose favoreceu as atividades das mesmas.

Efeito inibitório de glicose sobre as atividades de XR e XD também foi verificado para *Candida tenuis* (KERN *et al.*, 1997). Estes autores também constataram que as pentoses D-xilose e L-arabinose favoreceram as atividades dessas enzimas. Por outro lado, Silva e Felipe (2006), demonstraram que a presença de glicose no meio de cultivo em uma proporção de 1:5 em relação à xilose, pode afetar positivamente a bioconversão de xilose em xilitol quando as células de *C. guilliermondii* provêm de inóculo contendo somente xilose como fonte de carbono. Porém, estes autores não observaram correlação entre as condições favoráveis para a produção de xilitol e as enzimas XR e XD.

O papel da xilose como indutor das enzimas XR e XD depende da disponibilidade dos cofatores NADH_2 e NAD^+ em suas formas fosfatadas ou não, de acordo com o microorganismo (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998a). Várias pesquisas realizadas com a levedura *C. guilliermondii* para a produção de xilitol, destacaram a importância da presença destes cofatores para as atividades de XR e XD (SENE *et al.*, 2000; SENE *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2006).

No esquema ilustrado na **Figura 8**, pode-se observar uma série de reações envolvidas na produção biotecnológica de xilitol, com a participação dos açúcares glicose, xilose e arabinose como substratos, verificando-se a ocorrência de integração de vias metabólicas em diversas fases do metabolismo microbiano, nas quais as enzimas XR e XD

estão envolvidas. O metabolismo de açúcares inicia-se com o transporte destes através da membrana celular por diferentes mecanismos (WINKELHAUSEN, KUZMANOVA, 1998). A xilose, uma vez no interior das células é reduzida a xilitol, em uma reação catalisada pela enzima xilose redutase (E.C. 1.1.1.21) ligada a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada ou não, em sua forma reduzida (NADPH/NADH). O xilitol é oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (E.C. 1.1.1.9) ligada a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada ou não em sua forma oxidada (NADP⁺/NAD⁺). A xilulose é fosforilada a xilulose-5-fosfato que pode ser convertida em piruvato por meio da conexão da via das fosfopentoses com a via Embden-Meyerhof-Parnas (HAHN-HAGERDAL *et al*, 1994).

Segundo Lee *et al.* (1996), em pesquisa com a levedura *C. guilliermondii* foi verificada dependência estrita de NADPH para a xilose redutase (XR), enquanto no caso da XD houve preferencial afinidade por NAD⁺. De acordo com Barbosa *et al.* (1988) a preferência de XR pelo NADPH determina a parcial inabilidade da levedura para regenerar, sob condições limitadas de oxigênio, o NADH produzido pela atividade da XD, havendo necessidade de aumentar a produção de xilitol para o correto balanço redox.

Pesquisas realizadas com *C. guilliermondii* têm demonstrado o efeito de alguns parâmetros sobre as atividades das enzimas XR e XD. Silva *et al.* (1996), constataram que as maiores atividades das enzimas XR e XD de *C. guilliermondii* ocorreram quando a concentração de xilose no meio foi entre 70 e 170g/L. Sene *et al.* (2000) avaliaram a atividade das enzimas XR e XD de *C. guilliermondii*, variando o pH (2,5 a 7,0) e a temperatura (25 a 35°C) do meio de fermentação. Estes autores observaram que os maiores valores de atividade específica de XR e XD ocorreram em condições de pH e temperatura diferentes, sendo que não há uma correlação entre as condições ambientais necessárias para se obter alta atividade da XR e alto rendimento de xilitol, que foi verificado em pH 6,5 a 35°C. Segundo Sene *et al.* (2001), tanto XR quanto XD de *C. guilliermondii*, são pouco estáveis em valores extremos de

propicia o favorecimento da atividade de XR-NADPH dependente em detrimento da atividade de XD-NAD⁺ dependente.

Pesquisas para a determinação do K_M de XR e XD de *C. guilliermondii* com relação aos efeitos dos substratos e cofatores, revelaram que para a XR são necessários cerca de 10 vezes menos xilose e cofator em relação à XD para a condição em a que taxa de reação (XR:XD) é metade de $V_{máx.}$ (SENE *et al.*, 2001). De acordo com estes autores, isso poderia explicar o fato da produção de xilitol não necessitar de alta proporção XR:XD.

No caso da utilização de hidrolisados hemicelulósicos, como de bagaço de cana, para a produção de xilitol por *C. guilliermondii*, foi constatado que a presença de inibidores resultantes da hidrólise da biomassa contribui para a queda das atividades de XR e XD (ALVES *et al.*, 2002). Segundo Rodrigues *et al.* (2006), altas atividades enzimáticas de XR, favorecendo a produção de xilitol, poderiam ser alcançadas com a adaptação das células de *C. guilliermondii* no hidrolisado hemicelulósico de bagaço, obtida durante o preparo do inóculo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA

O hidrolisado foi obtido por hidrólise ácida do bagaço proveniente da Usina São José (Rio das Pedras, SP), utilizando-se reator de aço inox com capacidade volumétrica total de 100L, nas seguintes condições: temperatura de 150°C/ 30 min., empregando-se 100mg de H₂SO₄ (98%) por 1g de matéria seca e uma relação sólido-líquido de 1,75Kg de bagaço seco por 10L de solução ácida. Após a hidrólise, o hidrolisado foi armazenado em câmara fria a 4°C e posteriormente concentrado à vácuo em concentrador de aço inoxidável a 70°C, visando elevar o teor inicial de xilose em função de que o aumento da concentração inicial desta pentose favorece a produção de xilitol por *C. guilliermondii* (FELIPE *et al.*, 1997a), além de propiciar também a remoção parcial de compostos tóxicos voláteis. Esta metodologia vem sendo utilizada há vários anos nas pesquisas para produção de xilitol (ROBERTO *et al.*, 1991; PESSOA JR.; MANCILHA; SATO, 1997; FELIPE *et al.*, 1997a e b; ALVES *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2001; MARTON *et al.*, 2006). Após este procedimento o hidrolisado foi então submetido aos diferentes processos de destoxificação.

3.2 DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA

Na **Figura 9**, pode-se observar o esquema ilustrativo dos procedimentos de destoxificação empregados.

3.2.1 Alteração de pH e Adsorção em Carvão Vegetal Ativado

Este tratamento foi realizado empregando-se alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativado. A alteração de pH ocorreu pela elevação do pH inicial do hidrolisado para 7,0 com adição de CaO comercial, seguida da redução para 2,5 com H_3PO_4 . Posteriormente o hidrolisado foi submetido à adsorção em carvão ativado (1,0%), mantendo-se a mistura em frascos Erlenmeyer sob agitação de 100rpm a 60°C por 30 min (MARTON *et al.*, 2002). Ao final de cada uma destas etapas, o hidrolisado foi filtrado à vácuo empregando-se papel de filtro quantitativo para a remoção do precipitado formado.

3.2.2 Floculação por Polímero de Origem Vegetal

Foi utilizado o polímero vegetal extraído da casca da Acácia Negra (*Acacia mearnsii*) produzido pela empresa Acquaquímica, que tem em sua composição 18% de taninos, que possuem propriedades que permitem a remoção de compostos fenólicos presentes no meio a partir do processo de floculação (ACQUAQUÍMICA, 2007). As condições empregadas foram definidas por Silva (2006). O pH inicial do hidrolisado (0,58) foi elevado para 8,0 com óxido de cálcio e em seguida empregou-se a floculação por polímero vegetal (15% v/v) utilizando-se frascos Erlenmeyer sob agitação em incubadora de movimento rotatório a 200rpm, 25°C, durante 15 min. Ao final deste tratamento, o hidrolisado foi centrifugado a 2000x g, para a remoção do precipitado formado.

Figura 9- Representação esquemática das etapas de obtenção do hidrolisado hemicelulósico destoxificado.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO

O hidrolisado devidamente concentrado, previamente aos tratamentos e os resultantes dos diferentes métodos de destoxificação, foram caracterizados quanto ao pH, concentração de açúcares (xilose, glicose, arabinose), concentração de compostos tóxicos (ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural e compostos fenólicos), bem como íons metálicos (ferro, cromo, zinco, níquel) e cálcio.

3.4 FERMENTAÇÕES

3.4.1 Micro-organismo e Preparo do Inóculo

Foi utilizada a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, previamente selecionada e empregada para a produção de xilitol a partir do bagaço de cana-de-açúcar (FELIPE *et al.*, 1997a e b; MARTINEZ, SILVA, FELIPE, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2003 a e b; SILVA, HASMANN e FELIPE, 2006). O preparo do inóculo foi realizado a partir de metodologia previamente estabelecida, sendo as células provenientes de uma cultura estoque mantida a 4 °C em tubos inclinados com ágar extrato de malte. Alçadas desta cultura recém repicada, foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125ml, contendo 50ml de meio complexo composto de xilose (30g/L), extrato de farelo de arroz 20% (100ml/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2g/L) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1g/L).

As soluções estoque de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram preparadas separadamente nas concentrações de 250 e 50g/L, respectivamente e esterilizadas a 121°C por 20 min., enquanto a solução estoque de xilose a 300g/L foi autoclavada a 111°C por 15 min. A solução de extrato de farelo de arroz foi preparada separadamente numa concentração de 200g/L (200g de farelo acrescentado de 1L de H_2O destilada) e autoclavada a 111°C por 15 min.,

seguida de centrifugação a 2000xg (Cu-5000 – Damon/IEC Division), após a qual o resíduo sólido foi descartado e o sobrenadante utilizado para compor o meio, conforme metodologia empregada por diversos autores (FELIPE *et al.*, 1997 a; ALVES *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2003a).

O cultivo foi realizado em incubadora de movimento rotatório (New Brunswick, Scientific Co. Inc.) a 200rpm e 30°C por 24h. Em seguida as células foram recuperadas por centrifugação a 2000x g por 15 minutos e lavadas em água destilada esterilizada, centrifugadas novamente e após o descarte do sobrenadante, foram utilizadas para preparar uma suspensão de células a qual foi empregada como inóculo.

3.4.2 Meio e condições de fermentação

Os ensaios fermentativos foram realizados em triplicata com meios de fermentação formulados com o hidrolisado de bagaço destoxificado, o qual foi autoclavado a 111°C por 15min., anterior à utilização como meio de fermentação. O hidrolisado foi suplementado com os mesmos nutrientes empregados para o preparo do inóculo, exceto a xilose. Experimento controle foi realizado empregando hidrolisado concentrado, tendo somente seu pH ajustado para 5,5 com NaOH. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio com pH inicial de 5,5, incubados a 200rpm e 30°C, por 120 h.

Amostras foram coletadas e avaliadas quanto à concentração e viabilidade celular. Em seguida estas foram centrifugadas a 2000x g por 15 min., em cujo sobrenadante determinou-se o pH, concentrações dos açúcares (glicose, xilose, arabinose) e ácido acético, bem como xilitol e subprodutos deste metabolismo como glicerol e etanol. As células foram lavadas com água destilada esterilizada e após nova centrifugação, foram ressuspensas em solução tampão fosfato de

potássio 0,1M em pH 7,2 e armazenadas em freezer para posterior determinação de proteína solúvel e das atividades de XR e XDH. (SENE *et al.*, 2001; SILVA ; FELIPE, 2006).

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Viabilidade e Pureza da Cultura

A viabilidade celular foi verificada a partir de observações microscópicas de lâminas preparadas a fresco, nas quais as células foram coradas pela adição de igual volume de suspensão celular e uma solução 0,01% (p/v) de azul de metileno dissolvido em citrato de sódio 2% (p/v) (ODUMERO *et al.*, 1992), enquanto a pureza foi verificada a partir de lâminas fixadas e coradas com fucsina. As observações foram realizadas em microscópio óptico digital binocular (LABO) equipado com câmara digital de forma a fornecer dados referentes à morfologia celular.

3.5.2 Determinação da Concentração Celular

A determinação da concentração celular foi realizada por meio de turbidimetria a 600nm, onde a concentração de células em g/L foi calculada por uma curva de calibração que correlaciona a absorbância a 600nm e concentração em peso seco das células obtidas de um cultivo em meio sintético.

3.5.3 Determinação das Concentrações de Xilose, Glicose, Arabinose, Xilitol, Glicerol, Etanol e Ácido Acético

As concentrações dos açúcares, bem como de glicerol, etanol e ácido acético foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em condições previamente estabelecidas (RODRIGUES *et al.*, 2006): coluna “Bio-Rad Aminex” HPX-87H mantida a 45 °C; detector de índice de refração RID 6A; eluente ácido sulfúrico 0,01N, fluxo de 0,6 mL/min.; volume da amostra injetada, 20 µL. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro “Sep Pack” C18 (MILLIPORE).

3.5.4 Determinação das Concentrações de Furfural e Hidroximetilfurfural

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) foram determinadas também por cromatografia líquida (RODRIGUES *et al.*, 2001), nas seguintes condições: coluna Hewlett-Packard RP18 mantida a 25°C; detector de ultravioleta SPD-10A UV-VIS; eluente, solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; fluxo de 0,8 mL/min; volume da amostra injetada 20 µL. As amostras foram previamente filtradas em membrana Minisart 0,22 µm (MILLIPORE).

3.5.5 Determinação das Concentrações de Compostos Fenólicos

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada em conformidade com a metodologia descrita por Rocha (2000), fundamentada na avaliação dos compostos derivados de lignina, pela leitura de absorbância em espectrofotômetro a 280nm. O pH das amostras foi ajustado para 12,0, a fim de solubilizar os compostos derivados de lignina presentes no meio.

As amostras foram posteriormente diluídas e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 280nm.

A equação a seguir foi utilizada para expressar a concentração de lignina nas amostras:

$$C_{\text{lig}}(\text{g/L}) = 4,187 \cdot 10^{-2} (A_{\text{lig}280} - A_{\text{pd}280}) - 3,279 \cdot 10^{-4}$$

Onde: C_{lig} = concentração de lignina (g/L);

$A_{\text{lig}280}$ = absorbância da amostra a 280nm;

$A_{\text{pd}280}$ = absorbância dos produtos de decomposição de açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações foram determinadas por cromatografia líquida.

$$A_{\text{pd}280} = C_1 \epsilon_1 + C_2 \epsilon_2$$

Onde: C_1 e C_2 = concentrações de furfural e HMF, determinadas por cromatografia líquida.

ϵ_1 = coeficiente de extinção de furfural ($146,85 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

ϵ_2 = coeficiente de extinção HMF ($114,00 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.5.6 Determinação das Concentrações de Íons Metálicos e cálcio

Foram determinadas as concentrações de alguns íons metálicos como cromo, ferro, níquel e zinco, bem como de cálcio. Empregou-se espectrofotometria de adsorção atômica com atomização por chama em equipamento PerKinElmer modelo Analyst 800, conforme descrito por Marton (2005).

3.5.7 Rompimento Celular

Para a obtenção das enzimas intracelulares xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), as células de *C. guilliermondii* obtidas nos ensaios em shaker foram previamente descongeladas, centrifugadas a 2000x g por 15 minutos e ressuspensas em tampão fosfato de potássio 0,1M em pH 7,2 a uma concentração de 15 a 20g/L. Para o rompimento, foram empregadas esferas de vidro (diâmetro médio de 0,5 mm) sob agitação em vórtice. O método consiste em adicionar esferas de vidro a uma suspensão celular em proporção de 1:1 (v/v) e promover 5 ciclos de agitação em vórtice alternando com períodos de resfriamento em banho de gelo. Volume de 3mL de suspensão celular e 3mL de esferas de vidro foram colocados em tubo cônico e submetidos à agitação em vórtice por intervalo regular de tempo de 1 minuto, sendo que a cada 1 min de agitação, a suspensão foi resfriada em banho de gelo por 30s. Os *debris* celulares foram separados por centrifugação em centrífuga refrigerada (Jouan MR 1812) a 10.000rpm por 10min, a 4°C, recolhendo-se o sobrenadante para determinação das atividades de XR, XDH e proteína solúvel (GURPILHARES, 2004).

3.5.8 Determinação das Atividades Enzimáticas

A determinação das atividades de XR e XDH será realizada por espectrofotometria segundo método descrito por Alexander (1985), modificado por Sene *et al* (2001). O meio padrão de reação para XR foi constituído de 200µL de extrato livre de células, 570µL de água destilada, 150µL de β-mercaptoetanol (0,1M), 80µL de tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄-KHPO₄, 0,1M, pH 7,2), 100µL de NADPH (1,2mM), 200µL de xilose (0,5M), correspondendo a um volume total de 1,3mL. Para XDH, o meio padrão de reação foi

constituído de 100 μ L de extrato livre de células, 550 μ L de água destilada, 150 μ L de β -mercaptoetanol (0,1M), 200 μ L de TRIS (0,5M, pH 8,6), 150 μ L de NAD⁺ (1,26mM) e 150 μ L de xilitol (0,5M), correspondendo a um volume final de 1,3mL.

A atividade da XR foi determinada medindo-se o decréscimo da absorbância a 340nm decorrente da oxidação do NADPH, empregando-se xilose como substrato. A atividade da XDH foi determinada acompanhando-se o aumento da absorbância a 340nm decorrente da redução do NAD⁺, utilizando-se xilitol como substrato.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução/oxidação de 1 μ mol de cofator por minuto a temperatura ambiente, utilizando-se o coeficiente de extinção molar para os cofatores NADPH e NAD⁺ de 6220M⁻¹.cm⁻¹ (SENE *et al.*, 2001). As atividades específicas foram apresentadas em U.mg_{prot}⁻¹.

3.5.9 Determinação da Concentração de Proteína Solúvel

A determinação da concentração de proteína no extrato livre de células foi feita pelo método de BRADFORD (1976), empregando-se albumina bovina cristalizada (BSA) como padrão e reagente de Bradford (Azul-Brilhante de Coomassie G-250) como corante. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro BECKMAN DU[®] em 595nm.

3.5.10 Determinação de pH

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria, por meio de um aparelho da marca Micronal modelo B 474, com ajuste de temperatura.

3.6 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS

3.6.1 Rendimento ($Y_{P/S}$)

O rendimento (ou fator de conversão) expressa: massa de xilitol produzido por massa de xilose consumida, em gramas, e foi calculado pela seguinte equação:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i}$$

onde: S_i e S_f correspondem às concentrações inicial e final de xilose (g/L);

P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g/L).

3.6.2 Produtividade Volumétrica em Xilitol (Q_P)

A produtividade volumétrica concentração de xilitol produzida (g/L) por tempo (h), e é calculada de acordo com a seguinte equação:

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta T} = \frac{P_f - P_i}{T_f - T_i}$$

onde: P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g/L);

T_i e T_f correspondem aos tempos inicial e final de fermentação (h).

3.6.3 Eficiência de Conversão (η)

Este parâmetro fermentativo expresso em %, representa a razão entre o fator de conversão ($Y_{P/S}$) obtido experimentalmente e o fator de conversão teórico de 0,917g/g calculado segundo BARBOSA *et al.* (1988).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

A **Tabela 2** apresenta as características de composição química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, anterior e posterior aos procedimentos de concentração a vácuo e destoxificação. Verifica-se o aumento da concentração de açúcares e compostos tóxicos não voláteis com a concentração do hidrolisado, semelhante ao observado por outros autores (SENE *et al.*, 2001; MUSSATO; ROBERTO, 2002; FELIPE *et al.*, 2003; MARTON *et al.*, 2006; VILLARREAL *et al.*, 2006).

Tabela 2 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, antes e após a etapa de concentração e destoxificação pela adsorção com carvão ativado (A) e pela floculação por polímero vegetal (B).

		ORIGINAL	CONCENTRADO (FC=5)*	CONTROLE (pH=5,5)	TRATADO (A)	TRATADO (B)
AÇÚCARES (g/L)	Glicose	1,82	8,89	7,19	7,88	8,65
	Xilose	15,73	77,25	65,22	64,56	62,24
	Arabinose	1,45	6,52	6,38	6,30	4,42
COMPOSTOS TÓXICOS (g/L)	Ác. Acético	2,31	5,28	5,05	4,45	4,35
	Furfural	0,19	0,08	0,06	0,03	0,05
	HMF	0,02	0,07	0,03	0,02	0,02
	Fenóis Totais	5,48	12,74	14,66	2,56	5,90
ÍONS METÁLICOS E CÁLCIO (mg/L)	Cromo	19,08	320,00	231,00	21,42	18,54
	Ferro	171,62	2685,00	3387,12	9,30	2,08
	Zinco	1,40	6,52	4,14	< 0,1	0,58
	Níquel	14,96	187,24	407,50	192,60	170,20
	Cálcio	23,38	56,04	92,00	249,24	1938,60
pH		1,01	0,58	5,5	2,86	4,17
PERDA DE VOLUME (%)		-	-	0	40	46,5

(*) Concentração a vácuo do hidrolisado a um fator (FC) correspondente a 5 vezes a sua concentração original.

Constata-se que a xilose (15,725g/L) é o açúcar predominante no hidrolisado original, seguido de glicose (1,824g/L) e arabinose (1,454g/L), presentes em baixas

concentrações. Pesquisas têm revelado que baixas concentrações desta hexose favorecem a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, enquanto concentrações elevadas acarretam redução do rendimento e produtividade em xilitol (SILVA; FELIPE, 2006) devido ao efeito de repressão catabólica (LEE *et al.*, 1996). Pode-se ainda observar nesta tabela a presença de compostos tóxicos aos micro-organismos como ácido acético (2,309g/L), furfural (0,188g/L), hidroximetil furfural (0,024g/L) e compostos fenólicos (5,482g/L), conforme constatado em outros trabalhos, nos quais a hidrólise ácida foi o procedimento empregado para solubilização dos açúcares da fração hemicelulósica do bagaço de cana (RODRIGUES *et al.*, 2001; CARVALHO JUNIOR *et al.*, 2005; MARTON *et al.*, 2006; SILVA, 2006).

Com relação ao pH (Tabela 2), verificou-se diminuição do mesmo quando o hidrolisado hemicelulósico foi concentrado, provavelmente devido ao aumento da concentração de íons H^+ , provenientes do ácido sulfúrico utilizado na hidrólise ácida, além de ácidos gerados durante o processo de hidrólise (SILVA, 2006).

4.2 DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, após a etapa de concentração a vácuo, foi submetido aos procedimentos de destoxificação que consistiram na combinação de alteração de pH com a adsorção em carvão ativado e na floculação por polímero de origem vegetal, com vistas à avaliação destes procedimentos quanto à remoção de compostos tóxicos e açúcares. A eficácia destes procedimentos pode ser verificada na **Tabela 2** e **Figura 10**, onde se observa que ambos os tratamentos possibilitaram a redução da concentração de compostos tóxicos presentes no hidrolisado. Verifica-se ainda que a utilização de alteração de pH e posterior adsorção em carvão ativado propiciou maior remoção de fenóis totais (79,88%) e furfural (65,81%), sendo que para o ácido acético (17,52%) e HMF (71,53%), a floculação

por polímero vegetal foi mais eficaz. Verifica-se ainda, que a condição controle, ou seja, o simples ajuste de pH para 5,5, também permitiu a remoção de compostos tóxicos, exceto fenóis. Ao analisar o decréscimo da concentração de compostos tóxicos totais, observa-se que o procedimento que utiliza a combinação de alteração de pH e adsorção em carvão ativado foi o mais eficaz para a destoxificação do hidrolisado. Verifica-se também no presente trabalho, que ambos os tratamentos proporcionaram perda de volume ao final dos procedimentos, alcançando valores de 40 e 46,5% para a alteração de pH combinada ao carvão ativado e polímero vegetal respectivamente, o que não se observou no controle, quando se fez apenas o ajuste de pH.

Considerando-se que os métodos empregados permitiram a remoção parcial dos compostos tóxicos, pode-se constatar que as concentrações remanescentes no meio, nas condições de máxima remoção, foram: 4,35g/L de ácido acético, 0,028 g/L de furfural, 0,021 g/L de HMF e 2,56 g/L de fenóis totais. Tendo em vista que segundo Felipe *et al.* (1995 e 1999), concentrações acima de 3g/L de ácido acético e de 0,05g/L de fenóis totais podem inibir a bioconversão de xilose em xilitol, verifica-se que as concentrações destes compostos remanescentes no meio, podem interferir no rendimento e produtividade do processo. É importante lembrar que o efeito inibitório do metabolismo microbiano não deve ser atribuído às concentrações de cada composto por si só, mas à atuação sinérgica entre eles.

Com relação ao tratamento que consistiu na adsorção com carvão ativado, Marton (2002) encontrou valores de remoção superiores aos do presente trabalho para todos os compostos tóxicos avaliados, possivelmente devido à origem da matéria prima empregada. É importante considerar ainda que as condições de hidrólise do presente trabalho foram mais drásticas que as utilizadas por Marton (2002), em função da temperatura, tempo e concentração de ácido, o que pode ter levado à liberação de compostos desconhecidos e contribuído para modificar as características do hidrolisado hemicelulósico em questão.

Considerando o emprego de polímeros vegetais no processo de destoxificação de hidrolisado hemicelulósico, muito pouco é encontrado na literatura. De acordo com Silva (2006), foi constatada a remoção de 39,97 e 61,90% de HMF e fenóis totais respectivamente, enquanto no presente trabalho, foram observados valores de remoção superiores de HMF (71,53%) e inferiores de fenóis totais (53,67%) empregando-se o mesmo polímero.

Figura 10 - Remoção (%) de compostos tóxicos do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, submetido a diferentes procedimentos de destoxificação (■ pH+carvão ativado, ■ polímero vegetal, ■ controle).

Além da presença de compostos tóxicos, verifica-se na **Tabela 2**, já apresentada, que o hidrolisado hemicelulósico de bagaço contém também íons metálicos e cálcio. Segundo Watson, *et al.* (1984), a presença de metais nos hidrolisados pode ser devida à degradação do reator de hidrólise empregado no processo de hidrólise ácida. Além disto, a própria cana-de-açúcar pode contribuir para a presença destes como no caso do cromo detectado no colmo e no palmito, o níquel no palmito e nas folhas e o chumbo em todas as partes avaliadas da cana (CAMILOTTI *et al.*, 2007).

De acordo com as características do hidrolisado original empregado no presente trabalho (**Tabela 2**), verifica-se variação nas concentrações dos íons avaliados, sendo que o ferro encontra-se em maior concentração em relação aos demais. Nos resultados das pesquisas

com hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, também obtido por hidrólise ácida por Villarreal *et al.* (2006), verificou-se ser o ferro o íon presente em maior concentração em relação aos metais cromo, níquel e cobre.

A análise da **Tabela 2** revela que independente do procedimento de destoxificação empregado, as concentrações dos íons avaliados foram reduzidas, com exceção do cálcio para os dois procedimentos de destoxificação utilizados e também do níquel para a condição de destoxificação com alteração de pH, combinada ao carvão vegetal. Além disto, verifica-se que o íon cálcio teve suas concentrações aumentadas para todos os procedimentos de destoxificação utilizados. É provável que a etapa de elevação do pH com CaO, utilizada em ambas as metodologias de destoxificação, tenha propiciado o acúmulo de cálcio. É importante observar ainda que o simples ajuste de pH para a realização da fermentação (controle) resultou em perda de íons, como no caso do cromo e do zinco.

Com relação aos íons níquel e cromo (**Tabela 2**), verifica-se que após os tratamentos empregados, suas concentrações foram superiores a 0,01g/L, a qual foi considerada inibitória para o crescimento e a produção de etanol por *P. tannophilus* (WATSON *et al.*, 1984). Quanto ao íon ferro, os valores encontrados no presente trabalho após o emprego dos procedimentos de destoxificação são bastante inferiores à concentração de 10g/L sugerida por estes autores como responsável pelo decréscimo da produção de etanol por esta levedura, sendo ainda inferiores à concentração de 0,508g/L, considerada tóxica para a levedura *Cândida sp* (DÖNMEZ; AKSU, 2001). Coincidentemente, ao verificarmos a concentração de zinco presente no hidrolisado destoxificado, os valores encontrados (< 0,6mg/L) são bastante inferiores a 0,1 g/L, concentração esta considerada tóxica em pesquisas com *D. hansenii*, sendo suficiente para inibição da atividade de xiltol desidrogenase (GIRIO; PELICA; COLAÇO, 1996). Entretanto, estes autores revelaram que a sensibilidade a estes íons é variável, em função do tipo de micro-organismo.

Ao se avaliar os valores de remoção dos íons em função dos procedimentos de destoxificação do hidrolisado (**Figura 11**), observa-se que a utilização do polímero vegetal foi mais eficaz, pois proporcionou máxima remoção de ferro (99,9%), seguido do cromo (94,2%) e níquel (9,1%), enquanto, embora para o zinco esta condição não tenha propiciado maior remoção, verifica-se que a mesma foi expressiva (91,1%).

Figura 11: Remoção (%) de íons metálicos e cálcio do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, submetido a diferentes procedimentos de destoxificação (■ controle, ■ pH+carvão ativado, ■ polímero vegetal).

O zinco teve sua maior porcentagem de remoção (98,5%) após destoxificação do hidrolisado com alteração de pH, combinada ao carvão ativado, o que coincidiu com a condição de maior remoção de compostos fenólicos (79,88%). Já para o íon cálcio, não se verificou a remoção deste, conforme já mencionado anteriormente. Ainda podemos verificar na **Figura 11** que no caso do experimento controle, a remoção de íons, conforme já mencionado anteriormente, foi maior para o zinco (36,5%) e cromo (27,8%).

Outros autores também observaram a remoção de íons metálicos com a utilização de polímeros vegetais. Silva (2006) em pesquisas com hidrolisado hemicelulósico de bagaço

proveniente da moagem artesanal, verificou que a utilização de polímeros vegetais, nas mesmas condições do presente trabalho, foi capaz de remover esses íons, sendo que no caso do níquel, esta remoção (39,26%) foi superior à do presente trabalho, o que pode ser devido às características do hidrolisado hemicelulósico proveniente da moagem artesanal, conforme já relatado anteriormente.

Na literatura são escassos os trabalhos quanto à remoção de íons metálicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos com a utilização de carvão ativado. Em recente trabalho realizado por Mussato *et al.* (2010), foi relatada a remoção de cálcio, níquel, cromo, ferro e zinco, presentes no hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte. Entretanto, neste caso o carvão empregado foi procedente da lignina obtida do processo de hidrólise.

Embora no presente trabalho o objetivo dos tratamentos empregados tenha sido o de remover compostos tóxicos, verificou-se também que estes procedimentos levaram à perda de açúcares (**Figura 12**), o que é indesejado. Observa-se na **Figura 12** que o tratamento com polímero vegetal proporcionou as maiores perdas de xilose (19,43%) e arabinose (32,22%) em comparação com o tratamento combinado (alteração de pH e carvão ativado), que acarretou perdas de 16,44 e 3,28% respectivamente. Diferente do observado para xilose e arabinose, observou-se que a utilização do polímero vegetal resultou em perda de apenas 2,76% de glicose. Por outro lado, na condição controle (apenas ajuste de pH), a perda de glicose foi de 19,05%, sendo superior às perdas com ambos os tratamentos empregados, provavelmente como resultado do emprego de NaOH para ajuste do pH do hidrolisado controle.

Figura 12 - Perda (%) de açúcares do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido a diferentes procedimentos de destoxificação (■ pH+carvão ativado, ■ polímero vegetal, ■ controle).

Segundo Marton (2002), a destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando-se diferentes tipos de carvão ativado, promoveu também a redução da concentração de açúcares, em diferentes condições de adsorção, encontrando-se valores que variaram de 5,10 a 30,43% de perda dos mesmos.

De acordo com Silva (2006), a utilização de polímero vegetal na destoxificação de hidrolisado hemicelulósico proveniente de bagaço resultante do processo de moagem artesanal resultou, no caso de remoção dos açúcares xilose+frutose, valor quase 50% inferior ao observado no presente trabalho.

4.3 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO DESTOXIFICADO

A eficácia dos procedimentos de destoxificação sobre a fermentabilidade do meio formulado com os respectivos hidrolisados foi verificada a partir do cultivo de *Candida guilliermondii*, considerando o consumo de açúcares, crescimento celular, bioconversão de xilose em xilitol, formação dos subprodutos etanol e glicerol, representados nas **Figuras 13, 14 e 15**.

Com relação ao consumo de glicose (**Figura 13**), verifica-se que o tratamento do hidrolisado com alteração de pH combinada ao carvão ativado foi mais eficaz, observando-se consumo de 100% desta hexose após 24 horas de fermentação, enquanto, neste mesmo tempo, observou-se 88 e 57,86% de consumo nos meios formulados com hidrolisado tratado com polímero vegetal e controle, respectivamente. Silva (2006), utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana proveniente da moagem de cana de forma artesanal, destoxificado com polímero vegetal, também não observou consumo de 100% de glicose pela levedura *C. guilliermondii*, porém, atribuiu este fato ao alto teor de glicose presente no hidrolisado (32,95 g/L), valor este 74,81% superior ao observado no presente trabalho.

Por outro lado, verifica-se que o consumo de xilose pela levedura (**Figura 13**), foi influenciado pela presença de glicose no meio, observando-se que no caso da fermentação do hidrolisado controle, nas primeiras 24 horas houve consumo de 57,86% de glicose, ao passo que o consumo de xilose foi de apenas 3,34%. Observa-se ainda nesta figura, que os procedimentos de destoxificação utilizados favoreceram o consumo desta pentose, uma vez que a média do consumo referente aos tratamentos com alteração de pH combinada ao carvão ativado e polímero vegetal foi próxima de 27% no mesmo período.

Segundo Parajó *et al.* (1998b), a presença de hexoses no meio de fermentação pode inibir o metabolismo de xilose, por repressão e inativação do sistema de transporte da xilose ou de enzimas catabólicas. Verifica-se que o maior consumo de xilose após 120 horas de fermentação (99,52%), observado no presente trabalho, foi alcançado quando o hidrolisado foi destoxificado com alteração de pH combinada ao carvão ativado, sendo 2,95% superior ao encontrado por Marton (2002). No tocante ao emprego do polímero vegetal para destoxificação do hidrolisado, observa-se que o consumo de xilose (96,65%) foi superior ao encontrado por Silva (2006), que verificou consumo de 83,47% de xilose+frutose em meio formulado com hidrolisado obtido de bagaço de cana proveniente da moagem artesanal.

Quanto à arabinose (**Figura 13**), verifica-se que esta foi consumida lentamente, visto que ao final do processo fermentativo, o consumo máximo foi de 42,27%, verificado no meio em que se utilizou hidrolisado destoxificado com a combinação de alteração de pH e carvão ativado. Já no meio em que foi utilizado hidrolisado destoxificado com polímero vegetal, o consumo deste açúcar foi de 10,4% , ao passo que no meio contendo hidrolisado controle não se verificou consumo.

Verifica-se ainda no presente trabalho, que nas fermentações dos hidrolisados destoxificados, a arabinose foi mais rapidamente assimilada com o esgotamento da concentração de xilose no meio, o que não ocorreu com a utilização de hidrolisado controle. Alguns trabalhos têm demonstrado lento consumo de arabinose em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (FELIPE *et al.*, 1997a; SENE, 2000). Segundo Shi *et al.* (2000), este fato é decorrente da similaridade das vias metabólicas de utilização da xilose e arabinose, que têm o xilitol como intermediário comum.

Figura 13- Consumo de açúcares por *C. guilliermondii* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, submetido a diferentes procedimentos de destoxificação (—◆— Controle; —■— Polímero Vegetal; ▲— pH+Carvão ativado).

Ao se avaliar o efeito dos diferentes procedimentos de destoxificação empregados no presente trabalho, sobre a fermentabilidade do hidrolisado tratado, verifica-se que a

utilização da combinação de alteração de pH e carvão ativado, que resultou em maior taxa de remoção de fenóis totais (79,88%) e furfural (65,81%), promoveu maior consumo de açúcares, destacando-se o consumo de xilose equivalente a 99,52% após 120 horas de fermentação. No tocante ao polímero vegetal, verifica-se que houve maior remoção de ácido acético (17,52%) e HMF (71,53%), permitindo um consumo de xilose (96,66%) maior em relação ao alcançado no hidrolisado controle, cujo consumo de xilose foi de apenas 74,21% , não sendo observado remoção de fenóis totais, ocorrendo somente a remoção de ácido acético (4,21%), HMF (58,31%) e furfural (22,89%). Silva (2006) atribuiu o favorecimento do consumo de xilose+frutose, durante fermentação de *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana proveniente da moagem artesanal, à redução da concentração de compostos tóxicos proporcionada pela destoxificação do hidrolisado com polímeros vegetais.

O favorecimento do consumo de açúcares em hidrolisados hemicelulósicos destoxificados por diferentes métodos, foi também reportado por diversos autores em hidrolisados de diferentes naturezas como o de palha de trigo (CANILHA *et al.*, 2003), palha de arroz (MUSSATO; ROBERTO, 2002), casca de aveia (TAMANINI *et al.*, 2004), bagaço de malte (CARVALHEIRO *et al.*, 2004) e resíduos de eucalipto (VILLARREAL *et al.*, 2006). Villarreal *et al.* (2006), encontraram efeitos positivos sobre a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de resíduos de eucalipto pela destoxificação com carvão ativo e resinas de troca iônica, concluindo que esta ainda poderia ser melhorada com a remoção total do ácido acético e compostos fenólicos do meio. Segundo Felipe (2004), agentes inibidores encontrados em hidrolisados hemicelulósicos, podem limitar o consumo da fonte de carbono, podendo esta inibição ser acentuada devido ao efeito sinérgico entre os compostos tóxicos presentes no meio.

A evolução da produção de biomassa celular e xilitol durante a fermentação, podem ser observadas na **Figura 14**. Verifica-se que independentemente do processo de destoxificação utilizado, o valor inicial da biomassa aumentou três vezes nas primeiras 24 horas de fermentação, o que coincidiu com o consumo de glicose. Observa-se ainda que a produção de biomassa, ao final de 120h de fermentação, não foi favorecida pelos procedimentos de destoxificação utilizados.

Rodrigues *et al.* (1996), nas fermentações do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, não encontraram evidências de que o tratamento com carvão ativo tenha favorecido a formação de células de *C. guilliermondii*, o que foi também observado por Alves *et al.* (1998) e Marton (2002), em fermentações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando a mesma levedura. Por outro lado, Silva (2006), utilizando o mesmo polímero utilizado no presente trabalho, porém em hidrolisado de bagaço de cana proveniente da moagem artesanal, observou que o número de células/ml foi 50% maior no hidrolisado destoxificado quando comparado ao controle, sugerindo que o polímero modifica o metabolismo da célula, desviando o consumo de xilose para a produção de biomassa, o que pode justificar a baixa produção de xilitol observada por este autor.

Quanto à produção de xilitol (**Figura 14**), verifica-se que somente após o período de 24 horas de fermentação, coincidente com o esgotamento da glicose, houve expressivo aumento na sua concentração independentemente do procedimento de destoxificação avaliado. No caso da fermentação do hidrolisado controle, a produção deste poliál só ocorreu após 48 horas de fermentação, mesmo tendo havido consumo de 3,34% de xilose do meio no período de 24 horas de fermentação, o que pode ser justificado pela presença de elevadas concentrações de compostos tóxicos, havendo necessidade de um período maior para adaptação da levedura às condições adversas do meio.

Figura 14- Produção de biomassa e xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, submetido a diferentes procedimentos de destoxificação (—◆— Controle; —■— Polímero Vegetal; ▲— pH+Carvão ativado).

De fato, verifica-se que a maior produção de xilitol (49,87g/L) foi observada no hidrolisado destoxificado com a combinação de alteração de pH e carvão ativado, condição esta que proporcionou maior remoção de fenóis totais (79,88%) e furfural (65,81%). Por outro lado, verifica-se ainda na Fig. 14 que a utilização de polímero vegetal para destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço propiciou maior remoção de ácido acético (17,52%) e HMF (71,53%), resultando em baixa concentração de xilitol ao final do processo

fermentativo, sendo esta inferior em 26 e 64,61% em relação ao controle e hidrolisado destoxificado com a combinação de pH e carvão ativado respectivamente.

Pela avaliação dos parâmetros fermentativos, rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica de xilitol (Q_P), apresentados na **Figura 15**, fica evidente o favorecimento da fermentabilidade pela destoxificação do hidrolisado com o sistema combinado de alteração de pH e carvão ativado. Observa-se que os maiores valores de rendimento e produtividade volumétrica de xilitol, ocorreram exatamente com a utilização deste procedimento de destoxificação, sendo de 0,78 g/g e 0,48 g/L.h, respectivamente para $Y_{P/S}$ em 120 e Q_P em 96 h. de fermentação. Estes valores representam uma melhoria de 140% na produtividade volumétrica de xilitol quando a destoxificação ocorreu pelo sistema combinado (alteração de pH e carvão ativado) em relação ao controle. Embora o aumento no rendimento de xilitol tenha sido de apenas 8,33%, o maior valor de rendimento encontrado com a destoxificação pela combinação de alteração de pH e carvão ativado, corresponde à maior eficiência de bioconversão ($\eta = 85,43\%$), cujos dados podem ser observados na **Figura 16**.

Pesquisas conduzidas por Marton *et al.* (2006) também utilizando o procedimento de destoxificação pela alteração de pH combinada ao carvão ativado, durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço com *C. guilliermondii*, revelaram o efeito positivo deste procedimento na produção de xilitol, encontrando valores de 0,66g/g e 0,50g/L.h respectivamente para $Y_{P/S}$ e Q_P .

Fig.15 - Parâmetros fermentativos $Y_{p/S}$ (■) e Q_p (■), de *C. guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, submetido a diferentes procedimentos de destoxificação (**A**- Controle; **B**- Polímero Vegetal; **C**- pH+Carvão ativado).

A concentração inicial de xilose no hidrolisado destoxificado com alteração de pH e carvão ativado poderia justificar a maior produção de xilitol, visto que foi 11,58% superior à encontrada no hidrolisado destoxificado com polímero vegetal. Porém, como a concentração de xilose no hidrolisado controle foi a mesma que a verificada no hidrolisado destoxificado com polímero vegetal, conclui-se que, além da concentração de xilose outros fatores podem ter exercido influência negativa no processo fermentativo.

Fig 16- Eficiência de conversão (η) de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, submetido a diferentes procedimentos de destoxificação (■ Controle; ■ Polímero Vegetal; ■ pH+Carvão ativado)

Diferentemente do presente trabalho, Silva (2006) encontrou favorecimento da bioconversão de xilose em xilitol ao final do processo fermentativo, com a utilização de hidrolisado de bagaço de cana proveniente da moagem artesanal, destoxificado com polímero vegetal. Ainda segundo este autor, a baixa produção de xilitol observada, poderia ser justificada pela presença de traços do polímero no meio de fermentação, que como citado anteriormente, promoveriam o desvio do metabolismo para a produção de biomassa. Há que se considerar ainda, que a eficácia dos procedimentos de destoxificação sobre a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico, foi avaliada com relação a compostos previamente definidos no presente trabalho, mas outros compostos podem também estar presentes, os quais interferem no bioprocesso pela atuação individual ou sinérgica.

A fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, resultou não apenas na formação de xilitol, mas também de outros metabólitos como glicerol e etanol em todas as condições avaliadas (**Figura 17**).

Verifica-se maior produção de glicerol (1,74 g/L) no hidrolisado controle, ou seja, contendo maior teor de tóxicos em relação àqueles nos quais foram empregados os procedimentos de destoxificação. Segundo Nevoigt e Stahl (1997), tem sido atribuído ao glicerol o papel de soluto compatível em diferentes situações de stress em leveduras. Arruda e Felipe (2009) também observaram que a produção de glicerol como subproduto da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por *C. guilliermondii*, está relacionada com um provável mecanismo de defesa da levedura em condições de estresse celular. De fato, no presente trabalho, a maior produção de glicerol ocorreu no hidrolisado controle, valor correspondente a praticamente o dobro em relação ao hidrolisado destoxificado.

Observa-se também na **Figura 17** que independentemente do procedimento de destoxificação empregado, o consumo de glicerol coincide com o decréscimo da concentração de açúcares no meio, conforme já apresentado na **Figura 13**, sendo este utilizado como fonte de carbono pela levedura.

Outros autores constataram a produção desse subproduto durante a fermentação de *C. guilliermondii*, tanto em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado com carvão ativado (CARVALHO JUNIOR *et al.*, 2005) quanto em hidrolisado de bagaço de cana destoxificado com polímero vegetal (SILVA, 2006), bem como em meio sintético (ARRUDA; FELIPE, 2009).

Figura 17 - Formação de glicerol e etanol por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, submetido a diferentes procedimentos de destoxificação (—◆— Controle; —■— Polímero Vegetal; ▲—pH+Carvão ativado).

Quanto à formação de etanol (**Figura 17**), maior concentração foi observada com o emprego de hidrolisado destoxificado com polímero vegetal (7,29 g/L), o que correspondeu a uma produção 42,39 e 26,89% superior ao hidrolisado destoxificado com alteração de pH e carvão ativado, e ao controle respectivamente. A maior concentração de etanol obtida quando do emprego de hidrolisado destoxificado com polímero vegetal, pode estar associada ao fato de que nesta condição, a concentração de glicose (8,30 g/L) foi superior às encontradas no hidrolisado controle (6,93 g/L) e no hidrolisado destoxificado com a combinação de alteração de pH e carvão ativado (7,87g/L).

Verifica-se que independentemente do procedimento de destoxificação utilizado, o etanol também foi parcialmente consumido pela levedura, o que pode estar relacionado com a redução da concentração de açúcares no meio de fermentação (**Figura 13**).

Constata-se ainda, no presente trabalho, a capacidade da levedura *C. guilliermondii* de assimilar o ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, conforme demonstrado na **Figura 18**, independentemente do procedimento de destoxificação empregado. Nota-se ainda nesta figura a assimilação total deste ácido quando polímero vegetal foi empregado, enquanto no hidrolisado controle foi observado menor consumo. Tal comportamento pode ser atribuído à maior concentração de compostos tóxicos no meio controle. É importante lembrar que a toxicidade dos compostos se deve não apenas à ação individual, mas também à ação combinada com vários outros presentes no hidrolisado (FELIPE, 2004).

Verifica-se também na **Fig. 18**, que o consumo do ácido acético exerceu discreto efeito sobre o pH do meio de fermentação, independente do procedimento de destoxificação adotado no presente trabalho (alteração de pH combinada à adsorção por carvão ativado e polímero vegetal), não havendo alteração do pH na fermentação do hidrolisado controle.

Figura 18 - Consumo de ácido acético por *C. guilliermondii* e variação de pH em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, submetido a diferentes procedimentos de destoxificação (—◆— Controle; —■— Polímero Vegetal; —▲— pH+Carvão ativado).

4.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS PROCEDIMENTOS DE DESTOXIFICAÇÃO SOBRE AS ATIVIDADES DAS ENZIMAS XILOSE REDUTASE (XR) E XILITOL DESIDROGENASE (XD) DE *C. guilliermondii*.

As atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD), chaves no processo de bioconversão de xilose em xilitol, foram avaliadas considerando-se os diferentes procedimentos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço

utilizados no presente trabalho. A variação das atividades específicas destas enzimas em função do tempo pode ser verificada na **Figura 19**. Observa-se que independente do procedimento de destoxificação utilizado, no tempo de 24h. de fermentação ocorreu o decréscimo das atividades destas enzimas. Possivelmente, o fato de terem os procedimentos de destoxificação propiciado somente a remoção parcial de compostos tóxicos à levedura, pode ter contribuído para o decréscimo das atividades destas enzimas. É importante considerar que o inóculo foi cultivado em meio ausente destes tóxicos, o que pode ter levado à necessidade de adaptação das células ao hidrolisado em um primeiro momento.

A partir dos dados apresentados na **Figura 19** podemos constatar que enquanto a fermentação do hidrolisado controle (correspondente ao consumo de 74,2% de xilose) semelhante à fermentação do hidrolisado tratado com polímero vegetal (consumo de xilose de 96,6%), propiciou a máxima atividade enzimática de XR (0,446 e 0,381 U/mg_{prot.}, respectivamente) ao final da fermentação. No caso do hidrolisado tratado com o sistema combinado (alteração de pH e carvão ativado) o máximo valor de atividade desta enzima (0,308 U/mg_{prot.}) foi verificado com 96h. de fermentação, onde o consumo de xilose (96,38%) foi semelhante ao tratamento com polímero vegetal. Provavelmente, esta máxima atividade de XR após 96h. quando se empregou o tratamento combinado, se deve a que nestas condições ocorreu maior remoção de compostos fenólicos (Figura 10). De acordo com a literatura, a presença destes compostos propicia a inibição de matrizes enzimáticas (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000), e no caso da levedura *C. guilliermondii*, Felipe *et al.* (1999) atribuíram a redução da produtividade de xilitol em meio semi sintético contendo baixa concentração de fenólicos, à inibição da atividade da enzima XR. No hidrolisado controle a atividade específica de XR foi aproximadamente 31,05 e 14,57% superior aos maiores valores das atividades encontradas na fermentação do hidrolisado destoxificado com o sistema combinado (alteração de pH e carvão ativado) e polímero vegetal respectivamente.

Ao se avaliar os parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$ e Q_P verifica-se que não há uma correlação entre a condição de máxima atividade enzimática com os máximos valores destes, já que os valores máximos destes parâmetros (0,78g/g e 0,48g/L.h para $Y_{P/S}$ e Q_P respectivamente) foram observados quando utilizou-se o hidrolisado destoxificado com a combinação de alteração de pH e carvão ativado, anteriormente demonstrado na **Fig.15**.

Quanto à XD, verifica-se que a utilização do polímero vegetal propiciou a máxima atividade desta enzima (0,565 U/mg_{prot.}) ao final da fermentação (120h.), enquanto o ajuste de pH (controle) e a utilização do sistema combinado (alteração de pH e carvão ativado) propiciaram valores máximos de atividade desta enzima após 24 e 96h. de fermentação, respectivamente. É importante ressaltar que nestes dois últimos procedimentos, o consumo de xilose foi de apenas 3,33% para o controle, enquanto para o sistema combinado este foi de 96,38%; porém a quantidade de xilitol produzida (indutor desta enzima) nestes casos foi de 0,00 e 46,18 g/L, respectivamente. Possivelmente, a máxima atividade de XD com a utilização de polímero vegetal seja devida a que a utilização deste procedimento de destoxificação tenha propiciado maior remoção de íons metálicos como cromo, ferro e níquel, além de expressiva remoção de zinco (**Tabela 2 e Figura 11**). No hidrolisado destoxificado pelo sistema combinado (alteração de pH e carvão ativado) não houve remoção de íons níquel (**Fig. 11**), o que pode ter contribuído para as mais baixas atividades enzimáticas de XD observadas no presente trabalho (com exceção do tempo de 96 h.), resultando em acúmulo de xilitol e sua maior produtividade volumétrica (0,4811 g/L.h). Segundo a literatura, a presença destes metais pode inibir fortemente o crescimento de leveduras (WATSON *et al.*, 1984; DONMEZ; AKSU, 2001), sendo que pesquisas com *D. hansenii* revelaram forte inibição da enzima XD quando a concentração de zinco no meio foi de 0,75mM adicionado na forma de cloridrato de zinco (GIRIO; PELICA; COLAÇO, 1996). Em pesquisas realizadas com *Candida sp.*, Donmez e Aksu (2001) observaram ser esta levedura mais sensível ao níquel que

ao cobre, sendo seu crescimento totalmente inibido quando a concentração de níquel foi de 0,508 g/L.

Figura 19- Atividades das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido a diferentes procedimentos de destoxificação (—◆— Controle; —■— Polímero Vegetal; —▲— pH+Carvão ativado).

Além dos metais, é bem conhecido que compostos fenólicos e ácido acético também interferem nas atividades enzimáticas. No presente trabalho, para todas as condições de

tratamento utilizadas, estes compostos se mantiveram no meio de fermentação. Entretanto, serão necessárias mais pesquisas para a avaliação dos efeitos individuais destes sobre as atividades das enzimas XR e XD de *C. guilliermondii*, de forma a propiciar melhor esclarecimento ao papel destes tóxicos sobre as atividades destas enzimas. O efeito da concentração de ácido acético não foi destacado como interferente nas atividades enzimáticas de XR e XD, em virtude da diferença pouco significativa da remoção deste ácido observada com os dois procedimentos de destoxificação utilizados.

Em pesquisas realizadas por Alves *et al.* (2002), que também avaliaram a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço com o sistema combinado (alteração de pH e carvão ativo), observou-se o favorecimento da atividade enzimática de XR e baixa atividade de XD da levedura *C. guilliermondii*. Porém, neste caso a concentração de carvão ativo utilizada (3%) foi superior à do presente trabalho. Segundo estes autores, a utilização de H_3PO_4 para a redução do pH, juntamente com a interação entre este fator e o tempo de adsorção em carvão ativado, exercem efeito negativo sobre as atividades da XD e efeito positivo sobre as atividades da XR.

No caso específico da destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço com polímero vegetal, não há dados na literatura que possibilitem comparar a influência deste procedimento de destoxificação sobre as atividades das enzimas XR e XD, com aqueles apresentados no presente trabalho. Conforme já apresentado anteriormente, Silva (2006) pesquisando a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana proveniente da moagem artesanal, também empregou polímeros vegetais; porém os objetivos de suas pesquisas foram melhorar as condições de destoxificação com polímeros vegetais e obtenção de xilitol.

5. CONCLUSÕES

- Não houve um único tratamento capaz de proporcionar a máxima remoção de todos os compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.
- A perda de açúcares, principalmente da xilose (substrato para a produção de xilitol) não foi evitada em nenhum dos procedimentos de destoxificação avaliados.
- O favorecimento do consumo de açúcares presentes no hidrolisado ocorreu tanto na destoxificação por alteração de pH combinada ao carvão ativado quanto por polímero vegetal, quando comparado à condição controle (somente ajuste de pH).
- Maior consumo de açúcares e produção de xilitol, foram encontrados quando se empregou a alteração de pH combinada ao carvão ativado, o que coincidiu com a condição que propiciou maior remoção de compostos fenólicos e íons zinco.
- O glicerol, subproduto formado durante as fermentações dos hidrolisados destoxificados ou não, teve sua maior concentração no experimento controle, o que pode ser justificado pelo fato deste hidrolisado conter maior teor de tóxicos, já que um dos papéis do glicerol é a proteção celular.
- O etanol, formado também como subproduto durante as fermentações dos hidrolisados, teve sua produção favorecida quando se empregou polímero vegetal, coincidente com a maior remoção de íons ferro, cromo e níquel.

- Máximos valores dos parâmetros fermentativos rendimento ($Y_{P/S}=0,78\text{g/g}$) e produtividade ($Q_P=0,48\text{g/L.h}$) de xilitol coincidiram com a condição de maior remoção de compostos fenólicos, que foi quando se empregou alteração de pH combinada à adsorção com carvão ativado.
- Não há uma correlação entre as máximas atividades das enzimas XR e XD, e a condição de maior remoção de tóxicos e máximos parâmetros fermentativos, uma vez que não foi necessária a destoxificação do hidrolisado para a máxima atividade da XR ($0,446\text{ U/mg}_{\text{prot}}$), (controle), enquanto para a XD seu máximo valor ($0,565\text{ U/mg}_{\text{prot}}$) ocorreu com a utilização do polímero vegetal.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a interferência de outros parâmetros, como disponibilidade de O₂, sobre a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço destoxificado pelos procedimentos empregados.
- Avaliar a utilização de polímeros vegetais de diferentes origens, quanto à destoxificação e fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço.
- Avaliar a utilização de polímeros vegetais quanto à destoxificação e fermentabilidade de hidrolisados hemicelulósicos obtidos à partir de diferentes matérias primas, procedentes da agroindústria.
- Avaliar a influência dos diferentes íons metálicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço sobre as atividades das enzimas XR e XD de *C. guilliermondii*, empregando-se meio sintético.
- Aprofundar os estudos quanto ao papel do glicerol na bioconversão de xilose em xilitol a partir de hidrolisados destoxificados, mas que ainda contenham compostos tóxicos aos micro-organismos.

REFERÊNCIAS

- ACQUAQUÍMICA, 2007. **Produtos.** Disponível em: <http://www.seta-sa.com.br/site/aquaquimica/produto.php?codigo=23>. Acesso em Mar/2009.
- ACQUAQUÍMICA, 2005. **Tecnologia : Tratamento de água e efluentes.** Disponível em: http://www.setaonline.com/site/aquaquimica/tecnologia_agua.php. Acesso em Jan./2009.
- AGROSOFT BRASIL – **Produção de cana deve atingir 550 milhões de toneladas.** Disponível em: <http://www.agrosoft.org.br/agropag/210168.htm> . Acesso em Set/2009.
- ALANEN, P.; ISOKANGAS, P.; GUTMANN K. Xylitol candies in caries prevention: results of a field study in Estonian children. **Community Dent Oral Epidemiol.**, v.28. p.218-224, 2000.
- ALVES, L.; VITOLO, M.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of *Candida guilliermondii* as a function of different treatments of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate employing experimental design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98-100, p.403-413, 2002.
- ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA e SILVA, J. B.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p. 89-98, 1998.
- ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Role of glycerol addition on xylose to xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, v.58, n. 3, p.274-278, 2009.
- BARBOSA, M. F. S., MEDEIROS, M. B., MANCILHA, I. M., SCNEIDER, H., LEE, H. Screening of yeast for production of xylitol from d-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p.241-251, 1988.
- BATE-SMITH, E.C.; SWAIN, T. In: Mason, H.S., Florkin, A.M. (Eds), **Comparative Biochemistry**. Berlin: Springer, 1962. 764p.
- BICHO, P.; RUNNALS, P.L.; CUNNINGHAM, J.D.; LEE, H. Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachisolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, Jan., p.50-54, 1988.
- BINIÁK, S.; SWIATKOWSKI, A.;PAKULA, M. Eletrochemical studies of phenomena at active carbon-electrolyte solutions interfaces. In: Ljubisa R. Radovic eds. **Chemistry and Physics of Carbon**. New York: Marcel Dekker, 2001. vol. 27; cap.3, p. 126-216.
- BOLEN, P.L.; DETROY, R.W. Induction of NADPH-linked D-xylose reductase and NAD-linked xylitol dehydrogenase activities in *Pachisolen tannophilus* by D-xylose, L-arabinose or D- galactose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p.302-307, 1985.
- BRADFORD, M. A. Rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CAMILOTTI, F. *et al.* Acúmulo de metais pesados em cana-de-açúcar mediante a aplicação de lodo de esgoto e vinhaça. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.27, n. 1, p. 284-293, 2007.

CANILHA, L.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; CARVALHO, W. Batch xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using *Cândida guilliermondii* in a stirred tank reactor. **Biotechnology Letters**, v.25, p.1811-1814, 2003.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MEDEIROS, R.; GÍRIO, F.M. Optimization of brewery's spent grain dilute-acid hydrolysis for the production of pentose rich culture media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115, nº 1-3, p.1059-1072, 2004.

CARVALHO JUNIOR, R.; MARTON, J. M.; SILVA, F.; FELIPE, M. G A. Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. **Revista Analytica**, n.18, p.48-55, 2005.

CCC – CALORIE CONTROL COUNCIL. **Reduced-calorie sweeteners: Xylitol**. 2007. Disponível em: <http://www.caloriecontrol.org/xylitol.html>. Acesso em Ago/2009.

CETESB- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Câmara ambiental do setor sucroalcooleiro**. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/camaras/ca_ativas/sucroalcooleiro/sucroalcooleiro.asp. Acesso em: Out/ 2009.

CHIANG, C.; KNIGHT S. S. Metabolism of D-Xylose by moulds. **Nature**, v.188, n.4744, p.78-81, 1960.

CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Selection of hemicellulosic hydrolysate pretreatments and fermentation conditions to stimulate xylitol production by ethanol production yeasts. **Acta Biotechnologica**, v.16, p.133-144, 1996.

CRUZ, J.G.H. **Alternativas para aplicação de coagulante vegetal à base de tanino no tratamento do efluente de uma lavanderia industrial**. 2004. 62p. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Engenharia)-Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

CULBERT, S.J.; WANG, Y.M.; FRITSCH, H.A.Jr.; CARR, D.; LANTIN, E.; van EYS, J. Oral xylitol in american adults. **Nutrition Research**, v.6, n.8, p.913-922, 1986.

DAHIYA, J. S. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown medium containing D-Xylose. **Journal of Microbiology**, v.37 p. 14-18, 1991.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.27, p.445-459, 1999.

DITZELMULDER, G.; KUBICEK, C.P.; WÖHRER, W.; RÖHR, M. Xylose metabolism in *Pachysolen tannophilus*: purification and properties of xylose reductase. **Canadian Journal of Microbiology**, v.30, p.1330-1336, 1984.

DÖNMEZ, G.; AKSU, Z. Bioaccumulation of copper (II) and níquel (II) by the non-adapted and adaptedet growing *Candida sp*. **Water Research**, v.35. n.6, p.1425-1434, 2001.

DUARTE, L. C.; CARVALHEIRO, F.; NEVES, I.; GÍRIO, F.M. Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121-124, p.413-425, 2005.

ELLWOOD, K.C.; BHATHENA, S.J.; JOHANNENSEN, J.N.; BRYANT, M.A.; O'DONNELL, M.W. Biomarkers used to access the effect of dietary xylitol or sorbitol in the rat. **Nutrition Research**, v.19, n.11, p.1637-1648, 1999.

EMODI, A. Xylitol: it's properties and food applications. **Food Technology**, v.32, p.20-32, 1978.

FELIPE, M. G. A. Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials. In: Saha, B. C., Hayashi Kyoshi. eds. **Lignocellulose Biodegradation**. Washington: American Chemical Society, 2004. Cap. 18. p. 300-314.

FELIPE, M. G. A., HAULY, M. C. O., CANETTIERI, E. V, CÂNDIDO, E. J, TAMANINI, C. Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14. 2003. Florianópolis, SC. Universidade Federal de Santa Catarina. **Anais- CDROM**.

FELIPE, M.G.A.; RODRIGUES, R.C.L.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. Effect of phenol concentration on the xylose-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 21. 1999. Fort Collins, Colorado: University Park Holliday. Poster 2-22. **Program and Abstracts**.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.251-254,1997a.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v.13, n.1-2, p.11-14, 1997b.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M. Xylitol Formation by *Candida guilliermondii* grown in a sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate: Effect of aeration and inoculum adaptation. **Acta Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 73-79, 1996.

FELIPE, M. G. A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M; SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of acid acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v.35, p.171-177, 1995.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FRAZER, F.R.; Mc CASKEY, T.A. Wood hydrolysate treatments for improved fermentation of wood sugars to 2,3-butanediol. **Biomass**, v.18, p.31-42, 1989.

GÍRIO, F.; PELICA, F.; COLAÇO, M. T. Characterization of xylitol dehydrogenase from *Debaryomyces hansenii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.56, p.79-87, 1996.

GREENBANK, M.; SPOTTS, S. Effects of starting material on activated carbon characteristics and performance. **Industrial Water Treatment**, p.19-27, jan/fev, 1995.

GURPILHARES, D. B. **Produção de Glicose-6-fosfato desidrogenase a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Candida guilliermondii***. 2004. 71p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Departamento de Biotecnologia – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2004.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.933-943, 1994.

HEREDIA, J.B.; MARTÍN, J.S. Removing heavy metals from polluted surface water with a tannin-based flocculant agent. **Journal of Hazardous Materials**, v.165, p.1215-1218, 2009.

HYVÖNEN, L.; KOIVISTOINEN, P.; VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. **Advances in Food Research**, v.28, p.373-403, 1982.

KANDELMAN, D. Role of xylitol other polyols in dental preventive programs targeted for high caries risk populations. **Journal Odonto. Stomatol.**, v.10, n.2, p.93-102, 2003.

KERN, M.; HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D. Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS 4435. **FEMS Microbiology Letters**, v.149, p.31-37, 1997.

LEE, H.; SOPHER, C. R.; YAU, K. Y. F. Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed sugars in *Candida guilliermondii*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.66, p.375-379, 1996.

LIMA, L. H. A.; FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; TORRES, F.A.G. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v.65, p.734-738, 2004.

MÄKINEN, K.K.; ISOTUPA, K.P.; KIVILOMPOLO, T.; MÄKINEN, P.L.; TOIVANEN, J.; SODERLING, E. Comparison of erythritol and xylitol saliva stimulants in the control of dental plaque and *Mutans streptococci*. **Caries Research**, v.35, n.2, p.129-135, 2001.

MANZ, U.; VANNINEN, E.; VOIROL, F. Xylitol - Its properties and use as a sugar substitute in foods. In: FOOD R. A. SYMP. SUGAR AND SUGAR REPLACEMENTS, 10. 1973. **Abstracts**, p.9-38.

MARTINEZ, E. A. **Estudo do processo de cristalização de xilitol obtido por via fermentativa**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). 2005. 175p. Departamento de Biotecnologia- Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

MARTINEZ, E.A; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Effect of the oxygen transfer coefficient on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by continuous stirred-tank fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p.633-641, 2000.

MARTON, J.M. **Avaliação da performance de carvão ativo e resinas de troca iônica no desenvolvimento de um sistema de tratamento que minimize a toxicidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana à obtenção de xilitol**. 2005. 131p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Departamento de Biotecnologia- Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

MARTON, J. M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 103p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Departamento de Biotecnologia- Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2002.

MARTON, J.M.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; PESSOA JUNIOR, A. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.23, n.1, p.9-21, 2006.

MARTON, J.M.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B.. Avaliação de carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando planejamento de experimentos. **Revista Analítica**, n.3, p.45-53, 2003.

MASAKO, K.; HIDEYUKI, I.; SHIGEYUKI, O.; ZENRO, I. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. **Dermatological Science**, v.38, p.197-205, 2005a.

MASAKO, K.; YUSUKE, K.; HIDEYUKI, I.; ATSUKO, M.; YOSHIKI, M.; KAYOKO, M.; MAKOTO, K. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 2. A study to assess the effect of a cream containing farnesol and xylitol on atopic dry skin. **Dermatological Science**, v.38, p.207-213, 2005b.

MATTILA, P.T.; KNUUTTILA, M.L.E.; SVANBERG, M.J. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.47, p.578-583, 1998.

MATTILA, P.T.; KANGASMAA, H.; KNUUTTILA, M.L.E. The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.54, p.548-551, 2005.

MATOS, G. S. **Adaptação e reciclagem de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar: Efeito sobre as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase**. 2004. 107 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial)-Departamento de Biotecnologia- Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2004.

MELAJA, A. J.; HÄMÄLÄINEN, L. **Process for Making Xylitol**. US Patent 4.008.285. Dep 18 jun., 1975. Publ. 15 fev., 1977.

MORITA, T. A.; SILVA, S. S. Inhibition of mycrobial xylitol production by acetic acid and its relation with fermentative parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 801-808, 2000.

MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 28, p.34-39, 2002.

NEIVOGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p. 231-241, 1997.

ODUMERO, J.A.; D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Effect of heat and ethanol stress on the viability of a *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis) brewing yeast strain during fermentation of high gravity wort. **Journal of Industrial Microbiology**, v.10, p.111-116.

PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, 74, p.17-24, 2000.

PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v.65, p.191-201, 1998a.

PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. **Bioresource Technology**, v.65, p.203-212, 1998b.

PEPPER, T.; OLINGER, P.M. Xylitol in sugar-free confections. **Food Technology**, v.42, n.10, 1988.

PESSOA JÚNIOR, A.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Acid hidrólise of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.14, n.03, p. 291-297, 1997.

POURQUIE, J.; VANDECASTEELE, J. P. Conversão dos compostos lignocelulósicos por hidrólise enzimática e fermentação acetona-butanol. In: SCRIBAN, R. coord. **Biotechnologia**. São Paulo: Manole, 1985. Parte 6. Cap. 2. p. 427-428.

QUEIROZ, C.R.A.A.; MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A. Caracterização dos taninos da Aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v.26, n.4, p.485-492, 2002.

RANKBRASIL. **Recordes da categoria:** Agrícola. 2007 Disponível em: <http://www.rankbrasil.com.br/maismais/agricultura/default.asp>. Acesso em: Ago. 2009.

RIZZI, M.; ERLEMANN, P.; BUI-THANH, N.; DELLWEG, H. Xylose fermentation by yeasts. 4. Purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 29, p.148-154, 1988.

ROBERTO, I.C.; FELIPE, M.G.A.; LACIS, L.S.; SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xilitol production. **Bioresource Technology**, v.36, p.271-275, 1991

ROCHA, G.F.M. **Deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar assistida por oxigênio**. 2000. 136p. Tese (Doutorado). Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2000.

RODRIGUES, R. C. L. B. **Influência da disponibilidade de oxigênio no processo descontínuo de obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). 2005. 246 p. Instituto de Ciências Biomédicas-Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2005.

RODRIGUES, R.C.L.B.; SENE, L.; MATOS, G.S.; ROBERTO, I.C.; PESSOA Jr., A.; FELIPE, M.G.A. Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Current Microbiology**, v.53, p.53-59, 2006.

RODRIGUES, R. C. L. B., FELIPE, M. G. A., ALMEIDA E SILVA, J. B., VITOLO, M. Response Surface Methodology for Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate Using Controlled Vacuum Evaporation Process Variables. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1231-1237, 2003a.

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; PESSOA Jr, A.; PRATA, A. M. R. Crescimento de *Candida guilliermondii* durante cultivo descontínuo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: efeito do O₂. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14. 2003b. **Anais**, CD-ROM

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA e SILVA, J. B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P. V. The Influence of pH, Temperature and Hydrolysate Concentration on the Removal of Volatile and Non-Volatile Compounds from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate Treated With Activated Charcoal Before or After Vacuum Evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 03, p. 299-311, 2001.

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; PRATA, A.M.R. Avaliação do tratamento do hidrolisado de eucalipto com diferentes concentrações de carvão ativo na bioconversão de xilose a xilitol. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 48, 7-12 jul. 1996, São Paulo. **Anais**.

SAJJAN, U.; MOREIRA, J.; LIU, M.; HUMAR, A.; CHAPARRO, C.; FORSTNER, J.; KESHAYJEE, S. A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: inhibition of *Burkholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xylitol. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v.23, n.12, p.1382-1391, 2004.

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

SENE, L.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S.; VITOLO, M. Preliminary kinetic characterization of xylose reductase and xylitol dehydrogenase extracted from *Candida guilliermondii* FTI 20037 cultivated in Sugarcane Bagasse Hydrolysate for xylitol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.91-93, p.671-680, 2001.

SENE, L., VITOLO, M., FELIPE, M. G. A, SILVA, S. S. Effect of Environmental Conditions on Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Production in *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 371-380, 2000.

SHEN, P.; CAI, F.; NOWICKI, A.; VINCENT, J.; REYNOLDS, E.C. Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. **Journal of Dental Research**, v.80, n.12, p.2066-2070, 2001.

SHI, N.Q.; PRAHL,K.; HENDRICK, J.; CRUZ, J.; LU, P.; CHO, J.Y.; JONES, S.; JEFFRIES, T. Characterization and complementation of a *Pichia stipitis* mutant unable to grow on D-xylose or L-arabinose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.48-86, p.201-216, 2000.

SILVA, D. D. V. **Efeito da relação glicose:xilose na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2004. 82p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Dept. de Biotecnologia. Lorena, 2004.

SILVA, D.D.V.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Improvement of biotechnological xylitol production by glucose during culture of *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, p.207-215, 2007.

SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.G.A. Effect of glucose:xylose ratio on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p.1294-1300, 2006.

SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; PAULA, F. P. Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials. **Bioforum Europe**, v.8, n.3, p.56-57, 2004a.

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

SILVA, S.S.; RIBEIRO, J.D.; FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M. Maximizing the xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.63-65, p.557-564, 1997.

SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. Batch Fermentation of Xylose for Xylitol Production in Stirred Tank Bioreactor. **Process Biochemistry**, v.31, n.6, p.549-553, 1996.

SILVA, T.F.M. **Avaliação de polímeros de origem vegetal na destoxificação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de xilitol**. 2006. 75p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. Departamento de Biotecnologia Industrial, Lorena, 2006.

SILVA, T.F.M.; HASMANN, F.A.; FELIPE, M.G.A. Vegetable-origin polymers: a new system for the toxic compound removal from hemicellulosic hydrolysates. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOPARTITIONING AND PURIFICATION. 2007, Lisboa. **Book of Abstracts**.

SILVA, T.S.S. **Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e esgoto**. 1999. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1999.

TAMANINI, C.; OLIVEIRA, A.S.; FELIPE, M.G.A.; CANETTIERI, E.V.; CANDIDO, E.J.; HAULY, M.C.O. Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xilitol. **Acta Scientiarum Technology**, v.26, n. 2, p.117-125, 2004.

TAPIAINEN, T.; LUOTONEN, L.; KONTIOKARI, T.; RENKO, M.; UHARI, M. Xylitol administered only during respiratory infections failed to prevent acute otitis media. **Pediatrics**, v.109, n.2, p.19, 2002.

UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v. 19, p.144-147, 2001.

VANDESKA, E.; KUZMANOVA, S.; JEFFRIES, T.W. Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida boidinii* under different oxygen transfer rates. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80, p.513-516, 1995.

VILLARREAL, M.L.M.; PRATA, A.M.R.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.17-24, 2006.

VINAGRE, A. P.; ESPÓSITO, E. Estudo da biodegradação de polímeros naturais. In: IAU – SIMPÓSIO INTERNACIONAL UNICAMP. 2004, Campinas. **Anais**.

WANG, Y.M.; PATTERSON, J.H.; van EYS, J. The potencial use of xylitol in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency anemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v.50, p.1421-1428, 1971.

WATSON, N. E.; PRIOR, B.A.; LATEGAN, P.M.; LUSSI, M. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.6, p.451-456, 1984.

WEN, Z.T.; BROWNGARDT, C.; BURNE, R.A. Characterization of two operons that encode components of fructose-specific enzyme II of the sugar: phosphotransferase system of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v.205, p.337-342, 2001.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D- Xylose to Xylitol. **Journal of Fermentation and Biotechnology**, v.86, n.1, p.1-14, 1998.

YANG, V.W.; JEFFRIES, T.W. Purification and properties of xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, n.2, p.297-206, 1990.

YOKOYAMA, S.; SUZUKI, T.; KAWAI, K.; HORITSU, H.; TAKAMIZAWA, K. Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent D-xylose reductases from *Candida tropicalis* . **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p.217-223, 1995.

ZABNER, J.; SEILER, M.P.; LAUNSPACH, J.L.; KARP, P.H.; KEARNEY, W.R.; LOOK, D.C.; SMITH, J.J.; WELSH, M.J. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, n.21, p.11614-11619, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Concentrações de açúcares, ácido acético, glicerol e etanol durante as fermentações por *Candida guilliermondii*, de meios formulados com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, submetido a diferentes procedimentos de destoxificação

		0	24	48	72	96	120
GLICOSE (g/L)	CONTROLE	6,93	2,92	0,37	0,29	0,28	0,23
	pH+CARVÃO	7,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	POLÍMERO VEGETAL	8,30	1,00	0,82	0,33	0,00	0,00
XILOSE (g/L)	CONTROLE	56,38	54,50	47,62	42,76	28,68	14,54
	pH+CARVÃO	63,96	47,86	29,08	14,72	2,31	0,31
	POLÍMERO VEGETAL	56,55	40,57	31,77	17,57	6,99	1,89
ARABINOSE (g/L)	CONTROLE	5,05	6,26	5,32	5,17	5,09	5,15
	pH+CARVÃO	5,63	5,23	5,10	4,91	4,24	3,25
	POLÍMERO VEGETAL	4,71	4,58	4,91	5,48	5,50	4,22
XILITOL (g/L)	CONTROLE	0,00	0,00	4,38	9,76	15,72	23,85
	pH+CARVÃO	0,00	7,86	21,28	32,65	46,18	49,87
	POLÍMERO VEGETAL	0,00	2,23	6,73	12,64	16,07	17,65
ÁC. ACÉTICO (g/L)	CONTROLE	4,58	4,49	3,93	3,12	2,19	1,94
	pH+CARVÃO	4,37	3,77	3,36	2,75	1,83	0,98
	POLÍMERO VEGETAL	3,76	3,21	2,75	2,42	1,43	0,00
GLICEROL (g/L)	CONTROLE	0,00	1,04	1,26	1,28	1,35	1,74
	pH+CARVÃO	0,00	0,90	0,81	0,77	0,88	0,88
	POLÍMERO VEGETAL	0,00	0,71	0,39	0,47	0,68	0,76
ETANOL (g/L)	CONTROLE	0,00	2,46	4,85	5,33	6,23	5,84
	pH+CARVÃO	0,00	4,10	4,71	4,20	3,82	3,60
	POLÍMERO VEGETAL	0,00	5,23	5,08	7,29	6,48	5,34

APÊNDICE B – Parâmetros fermentativos durante as fermentações por *C. guilliermondii*, de meios formulados com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, submetido a diferentes procedimentos de destoxificação

Tempo (h)	Yp/s (g/g)			Qp (g/Lh)			η (%)		
	Controle	pH+Carvão	Polímero vegetal	Controle	pH+Carvão	Polímero vegetal	Controle	pH+Carvão	Polímero vegetal
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,49	0,14	0,00	0,33	0,09	0,00	53,21	15,22
48	0,50	0,61	0,27	0,09	0,44	0,14	54,47	66,52	29,62
72	0,72	0,66	0,32	0,14	0,45	0,18	78,15	72,30	35,36
96	0,57	0,75	0,32	0,16	0,48	0,17	61,90	81,69	35,36
120	0,57	0,78	0,32	0,20	0,42	0,15	62,16	85,43	35,21

APÊNDICE C – Curva de proteínas empregando-se albumina bovina cristalizada (BSA) como padrão e reagente de Bradford (Azul-Brilhante de Coomassie G-250) como corante.

APÊNDICE D – Valores de proteína e atividades enzimáticas específicas das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD) durante as fermentações por *C. guilliermondii*, de meios formulados com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, submetido a diferentes procedimentos de destoxificação

Tempo (h)	PROTEÍNA (mg/L)			XR (U/mg _{prot.})			XD (U/mg _{prot.})		
	Controle	pH+Carvão	Polímero vegetal	Controle	pH+Carvão	Polímero vegetal	Controle	pH+Carvão	Polímero vegetal
0	454,54	241,38	321,31	0,37	0,56	0,48	0,76	0,46	0,87
24	344,03	375,08	717,18	0,11	0,25	0,22	0,49	0,19	0,39
48	475,51	473,00	932,18	0,17	0,27	0,21	0,45	0,15	0,42
72	372,26	400,54	772,56	0,41	0,29	0,23	0,13	0,15	0,49
96	494,36	404,00	1291,92	0,27	0,31	0,14	0,11	0,28	0,40
120	491,38	290,05	443,26	0,45	0,30	0,38	0,33	0,16	0,56